

# **Entwicklung und Implementierung einer internen Kontrolle für die PCR-Diagnostik humanpathogener DNA-Viren**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Kathrin Stein, geborene Ohse  
am 06.12.1981 in Darmstadt

angefertigt am: Institut für Virologie der  
Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. U. G. Liebert  
Frau M. Maier

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 21.01.2014

**Gewidmet meinen Eltern und Carsten**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Bibliografische Beschreibung .....	VII
Abkürzungen .....	VIII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Virusdiagnostik mittels Polymerase Kettenreaktion .....	1
1.2 Kontrollen für die Durchführung von PCR-Untersuchungen .....	1
1.2.1 Externe und interne Kontrollen bei der PCR.....	1
1.2.2 Notwendigkeit interner Kontrollen.....	3
1.2.3 Inhibitoren der PCR.....	4
1.2.4 Verschiedene Methoden der internen Kontrolle.....	5
1.3 Baculovirus.....	9
1.3.1 Struktur und Klassifikation der Baculoviren .....	9
1.3.2 Genom und Proteine .....	10
1.3.3 Infektionszyklus .....	10
1.3.4 Replikationszyklus .....	11
1.3.5 Transkription .....	12
1.3.6 Baculoviren in der Biotechnologie .....	12
1.4 Ziel der Arbeit .....	13
<b>2 Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Manuelle Extraktion von Nukleinsäuren.....	14
2.2 Automatische Extraktion von Nukleinsäuren.....	14
2.3 Gelelektrophorese.....	15
2.4 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion .....	16
2.5 Auswahl der Baculovirussequenz.....	17
2.5.1 Länge und Guanin-Cytosin-Gehalt der Baculovirusamplifikate .....	18
2.5.2 Primer für die Baculovirus-Polymerase-Kettenreaktion .....	18
2.5.3 Sonden für das Baculovirus-Amplifikat .....	19
2.6 Bindungsselektivität der Primer und Sonden .....	19
2.6.1 Verdünnung und Quantifizierung der Baculovirusamplifikate .....	19
2.6.2 Bindungsselektivität der Primer und Sonden gegenüber humanem Genom ..	20
2.6.3 Bindungsselektivität der Primer und Sonden bei Zellkulturen und deren Überstände.....	20
2.6.4 Beeinträchtigungen der PCR durch den Baculovirus-Mastermix und das Baculovirus.....	21
2.7 Stabilität des Baculovirus .....	23
2.7.1 Langzeit-Stabilität von Baculovirus-Zellkulturüberstand bei 4°C .....	23
2.7.2 Kurzzeit-Stabilität bei unterschiedlichen Temperaturen .....	23
2.7.3 Reproduzierbarkeit des Baculovirus-Lysispuffer-Ansatzes .....	24
2.8 Herstellung einer Standardkurve für das Baculovirus .....	24
2.9 Vergleich zwischen Baculovirus im Lysispuffer und als Probe.....	27
2.10 Interferenz zwischen Baculovirus und HSV bzw. CMV .....	27
	III

# Inhaltsverzeichnis

---

2.11	Patientenproben .....	29
2.12	Auswertung der Ergebnisse .....	30
3	Ergebnisse .....	32
3.1	Auswahl der Baculosequenz, -primer und -sonden .....	32
3.2	Verdünnung und Quantifizierung des Baculovirus .....	33
3.3	Bindungsselektivität der Primer und Sonden .....	35
3.3.1	Bindungsselektivität der Primer und Sonden gegenüber humanem Genom ..	35
3.3.2	Bindungsselektivität der Primer und Sonden bei Zellkulturen und deren Überstände .....	39
3.3.3	Veränderungen der PCR durch den Baculovirus-Mastermix und das Baculovirus .....	39
3.4	Stabilität des Baculovirus .....	41
3.4.1	Langzeitstabilität des Baculovirus-Zellkulturüberstandes .....	41
3.4.2	Kurzzeitstabilität bei verschiedenen Temperaturen .....	42
3.4.3	Reproduzierbarkeit des Baculovirus-Lysispuffer-Ansatzes .....	44
3.5	Herstellung einer Standardkurve .....	45
3.6	Vergleich zwischen Baculovirus im Lysispuffer und als Probe .....	48
3.7	Interferenz .....	49
3.8	Patientenproben .....	55
3.8.1	HBV-Patientenproben .....	55
3.8.2	HSV-Patientendaten .....	57
3.8.3	CMV-Patientenproben .....	59
4	Diskussion .....	62
4.1	Entwicklung der internen Kontrolle .....	62
4.2	Implementierung der internen Kontrolle .....	63
4.3	Patientenproben .....	66
4.4	Ausblick .....	70
5	Zusammenfassung .....	72
6	Literaturverzeichnis .....	77
7	Anhang .....	84
7.1	Übersicht über die Eigenschaften der Viren .....	84
7.2	Mastermixe und Lightcycler Protokolle .....	86
7.2.1	Baculovirus mit Sonden .....	87
7.2.2	HBV .....	88
7.2.3	HBV mit Baculovirus .....	89
7.2.4	HSV .....	90
7.2.5	HSV mit Baculovirus .....	91
7.2.6	CMV .....	92
7.2.7	CMV mit Baculovirus .....	93
	Danksagung .....	94
	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit .....	95

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Infektionszyklus des Baculovirus .....	11
Abbildung 2:	Darstellung der Baculovirus-Amplifikate .....	33
Abbildung 3:	Vergleich der PCR-Effizienz bei verschiedenen Amplifikatlängen .....	34
Abbildung 4:	PCR-Amplifikationskurve zur Bindungsgenauigkeit von Primer und Sonden.....	36
Abbildung 5:	PCR-Schmelzkurve zur Bindungsgenauigkeit von Primer und Sonden....	37
Abbildung 6:	Agarosegel zur Bindungsgenauigkeit der Primer und Sonden .....	38
Abbildung 7:	Einfluss der Lagerung der internen Kontrolle auf deren Stabilität .....	41
Abbildung 8:	PCR-Amplifikationskurve der Woche 7 bei einer Lagerung über 10 Wochen .....	42
Abbildung 9:	PCR-Amplifikationskurve mit Proben unterschiedlicher Lagerungstemperaturen.....	44
Abbildung 10:	Nachweis der Insertion der Baculovirusfragmente in der Echtzeit-PCR...	45
Abbildung 11:	PCR Amplifikationskurve der Plasmidverdünnungsreihe zur Standardisierung der Baculovirus-DNA .....	47
Abbildung 12:	Logarithmische Darstellung der Standardkurve .....	47
Abbildung 13:	Crossing points bei der Extraktion als Probe oder im Lysispuffer .....	48
Abbildung 14:	Verschiedene CMV-Konzentration amplifiziert mit verschiedenen Baculovirus-Konzentrationen .....	50
Abbildung 15:	Verschiedene Konzentrationen Baculovirus in Abhängigkeit von HSV und CMV-Konzentrationen.....	51
Abbildung 16:	PCR-Amplifikationskurven von CMV mit 10 Kopien/Ansatz Baculovirus im Lysispuffer .....	52
Abbildung 17:	PCR-Amplifikationskurven des Baculovirus mit verschiedenen CMV-Konzentrationen .....	53
Abbildung 18:	Crossing points des Baculovirus in Abhängigkeit von HSV und CMV ....	54
Abbildung 19:	Regressiongerade zwischen HBV mit und ohne Baculovirus als interne Kontrolle .....	56
Abbildung 20:	Crossing point-Differenz zwischen HBV mit und ohne Baculovirus.....	57
Abbildung 21:	Regressiongerade zwischen HSV mit und ohne Baculovirus als interne Kontrolle .....	58
Abbildung 22:	Crossing point-Differenz zwischen HSV mit und ohne Baculovirus .....	59
Abbildung 23:	Regressiongerade zwischen CMV mit und ohne Baculovirus als interne Kontrolle .....	60
Abbildung 24:	Crossing point-Differenz zwischen CMV mit und ohne Baculovirus .....	61

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der Baculovirus-Primer .....	32
Tabelle 2	Übersicht der Baculovirussonden .....	33
Tabelle 3:	Verdünnungsreihe des Baculovirus mit crossing points und Konzentration .....	34
Tabelle 4:	Einfluss der zugegebenen Faktoren auf die HBV-Amplifikation .....	40
Tabelle 5:	Signifikanztest zur Lagerung über 1 Woche bei Kühlschranktemperatur .	43
Tabelle 6:	Signifikanztest zur Lagerung über 1 Woche bei Raumtemperatur .....	43
Tabelle 7	Eigenschaften der Viren mit kleiner Amplifikatlänge .....	84
Tabelle 8	Eigenschaft der Viren mit mittlerer Amplifikatlänge .....	85
Tabelle 9	Eigenschaften des Virus mit langer Amplifikatlänge .....	85

## Bibliografische Beschreibung

Kathrin Stein, geb. Ohse

### **Entwicklung und Implementierung einer internen Kontrolle für die PCR-Diagnostik humanpathogener DNA-Viren**

Universität Leipzig, Dissertation

105 S., 83 Lit., 24 Abb., 9 Tab., 10 S. Anlagen

#### Referat:

Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Implementierung einer internen Extraktions-Kontrolle für die quantitative Echtzeit-PCR humanpathogener DNA-haltiger Viren der Routinediagnostik des Instituts für Virologie der Universität Leipzig, basierend auf einem artfremden Vollvirus. Durch Verwendung einer internen Kontrolle sollen falsch-negative PCR-Ergebnisse aufgrund unzureichender DNA-Extraktion aus humanem Probenmaterial identifiziert werden. Die interne Kontrolle soll zur Zeitersparnis als Multiplex-PCR durchgeführt werden.

Verwendet wurde das Baculovirus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*, da keine Baculovirus-Infektionen beim Menschen vorkommen.

Es wurden Primer und Sonden so entwickelt, dass sowohl das Amplifikat als auch Primer und Sonden eine hohe Übereinstimmung zu den Amplifikaten, Primern und Sonden der humanpathogenen Viren zeigen. Dadurch soll die PCR-Effizienz der internen Kontrolle möglichst ähnlich zu der PCR-Effizienz der humanpathogenen Viren sein.

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass eine Hybridisierung der Baculovirus-Primern und -Sonden an das Genom humanpathogener Viren und das humane Genom minimal war. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass sich die Baculovirus-DNA als interne Kontrolle vermischt mit Lysispuffer über mindestens eine Woche bei 4°C ohne signifikante Verluste lagern lässt.

Im vorgestellten und validierten Protokoll wird die interne Kontrolle automatisch während der maschinellen DNA-Extraktion zu jeder Probe hinzugegeben. An bereits positiv getesteten Patientenproben konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von 10-20 Kopien Baculovirus pro Ansatz sicher nachweisbar sind und gleichzeitig auch geringe DNA-Mengen an humanpathogener Viren sicher nachgewiesen werden.

### Abkürzungen

AcMNPV	<i>Autographa californica multicausid nucleopolyhedrovirus</i>
AT	Adenosin/Thymin
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	<i>budded virus</i> , Infektionsart der Baculoviren zur Zell-Zell-Infektion innerhalb eines Organismus
C	Cytosin
c	<i>concentration</i> , dt. Konzentration
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , dt. komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
cp	<i>Crossing points</i> , auch Zyklus
d	<i>dies</i> , dt. Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , dt. Desoxyribonukleinsäure
E	Effizienz der PCR
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFP	<i>Envelope fusion protein</i> , dt. virales Fusionsprotein
FRET-Sonden	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer-Sonden
G	Guanin
G3PDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GV	Granulovirus, Subklasse der Baculoviren
HBV	Hepatitis B-Virus
HHV 6	Humanes Herpes Virus 6
HRS	<i>Homologous region sequences</i> , dt. homologe, sich wiederholende Desoxyribonukleinsäure -Sequenzen
HSV	<i>Herpes simplex</i> -Virus



## Abkürzungen

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IgG	Imunglobulin Gamma
K	Konzentration der kompetitiven internen Kontrolle nach PCR
K'	Konzentration der kompetitiven internen Kontrolle vor PCR
kb	Kilobasen, 1000 Basenpaare
LC	Light Cycller
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
MNPV	<i>Multiple Nucleopolyhedrosisvirus</i> , Subklasse der Baculoviren
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , dt. Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl (der PCR-Zyklen)
OD	Absorption
ORF	<i>open reading frame</i> , dt. Offenes Lesemuster
OV	<i>occluded virus</i> , langlebige Infektionsart der Baculoviren zwischen zwei Wirtsorganismen
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , dt. Polymerase Kettenreaktion
Pl	Plasma
PVB 19	Parvovirus B 19
RNA	<i>Ribonuclein acid</i> , dt. Ribonukleinsäure
Rpm	<i>rounds per minute</i> , dt. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Se	Serum
Sf9- Zellen	<i>Spodoptera frugiperda</i> Klonisolation 9 Zellen
Sf21-Zellen	<i>Spodoptera frugiperda</i> Klonisolation 21 Zellen
SNPV	<i>Single Nucleopolyhedrosisvirus</i> , Subklasse der Baculoviren
ssDNA	<i>single-strain DNA</i> , dt. Einzelstrang- Desoxyribonukleinsäure
T	Targetkonzentration nach einer PCR
T'	Targetkonzentration vor einer PCR
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
V	Verdünnungsfaktor
VZV	Varizella-Zoster Virus
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Virusdiagnostik mittels Polymerase Kettenreaktion

Das Verfahren der Polymerase Kettenreaktion (englisch *polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1971 erstmalig von Kleppe und Kollegen beschrieben (Kleppe et al., 1971) und durch die Entdeckung der Taq-Polymerase vereinfacht (Saiki et al., 1985). Für die Wiederentdeckung und Weiterentwicklung 1983 erhielt Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie. Bei der PCR werden Genomabschnitte mit Hilfe von kurzen komplementären DNA-Abschnitten, sogenannten Primern, und dem Enzym Polymerase vervielfältigt, so dass geringste DNA-Konzentrationen aus verschiedenen Probenmaterialien nachgewiesen werden können. Die PCR hat die Diagnostik und Erforschung von Viren grundlegend verändert, da die Virusanzüchtung in Zellkulturen weitgehend ersetzt werden konnte und sich die Nachweiszeit auf einen Arbeitstag verkürzt. Desweiteren ist es möglich, Viruslasten unter der Therapie zu dokumentieren und Resistenzen gegen Virustatika zu ermitteln. Eine Bestimmung der Virulenz oder Infektiösität ist mit der PCR allerdings nicht möglich. In einer Multiplex-PCR ist es möglich, mehrere verschiedene DNA-Abschnitte gleichzeitig zu amplifizieren und durch verschiedene Markierungen zu detektieren und zu differenzieren.

Die PCR ist mittlerweile ein etabliertes Routineverfahren, zugleich aber auch störanfällig, da durch die hohe Sensitivität geringste Kontaminationen zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Außerdem kann es bei der Probenextraktion zu einem Verlust des Targets kommen, oder die Reaktionen können durch verbliebene Hemmstoffe gestört werden. So können falsch-negative Ergebnisse entstehen oder zu geringere Viruslast nachgewiesen werden.

## 1.2 Kontrollen für die Durchführung von PCR-Untersuchungen

### 1.2.1 Externe und interne Kontrollen bei der PCR

Um PCR-Ergebnisse klinischer Untersuchungen sicherer bewerten zu können, werden in der Diagnostik sowohl externe als auch interne Kontrollen verwendet.

Externe Kontrollen setzen sich aus mindestens einer negativen und einer positiven Kontrolle zusammen, die in separaten Reaktionsgefäßen als zusätzliche Messungen analysiert werden. Hierbei fehlt der Negativkontrolle die nachzuweisende DNA, die Probe wird durch Wasser (*Aqua ad iniectabilia*), Pufferlösungen oder sicher Virus-freie

Patientenproben ersetzt. Wird dennoch DNA amplifiziert, so handelt es sich um eine Kontamination, die z. B. aus Reagenzien stammt oder an Arbeitsmaterialien und Oberflächen haftet.

Als Positivkontrolle wird Material zugegeben, das das nachzuweisende Virus sicher enthält, wie z. B. Zellkulturüberstände, Plasmidpräparationen oder vorgetestete Patientenproben. Mit der Positivkontrolle weist man nach, dass die PCR technisch einwandfrei funktioniert hat, das heißt, dass alle für den Test erforderlichen Reagenzien enthalten waren, dass die Enzyme intakt waren, und Versuchsaufbau und Versuchsbedingungen stimmten. Durch die parallelen Ansätze von Probe und Kontrolle entsteht keine Konkurrenzsituation zu der gesuchten DNA in den Proben.

Bei internen Kontrollen wird die Kontroll-DNA in das gleiche Reaktionsgefäß gegeben, wie die Patientenprobe. Interne Kontrollen spiegeln die Situation in jedem einzelnen Reaktionsgefäß wider und kontrollieren somit jede einzelne Probe. Prinzipiell sind vier Versuchsergebnisse denkbar:

1. Werden sowohl die interne Kontrolle als auch die gesuchte DNA negativ in der PCR getestet, wird von einer Hemmung ausgegangen.
2. Wird nur die gesuchte DNA negativ getestet und die interne Kontrolle positiv, so lag keine oder keine ausreichende Menge an gesuchter DNA im Versuchsansatz vor.
3. Wenn nur das Resultat der gesuchten DNA positiv und das Resultat der internen Kontrolle negativ ist, dann wurde die interne Kontrolle als schwächerer Partner von der gesuchten DNA unterdrückt.
4. Sind sowohl Patientenprobe als auch interne Kontrolle positiv, wurde die PCR erfolgreich durchgeführt.

Es kann natürlich auch eine Kombination der Möglichkeiten auftreten, wenn eine niedrig-positive gesuchte DNA mit einer geringen Inhibition zusammentrifft und damit die gesuchte DNA und interne Kontrolle unterdrückt werden. Interne Kontrolle und humanpathogenes Virus konkurrieren in einer Multiplex-PCR immer um Nukleotide und Polymerase und je nach Konstruktion der internen Kontrolle auch um die gleichen Primer (Stöcher et al., 2002). Kommt es zu einer Beeinträchtigung der humanpathogenen Viren durch die Zugabe der internen Kontrolle, soll die interne Kontrolle als sequenzieller Zweitansatz durchgeführt werden.

## 1.2.2 Notwendigkeit interner Kontrollen

Externe Kontrollen überwachen die globalen Verhältnisse im gesamten PCR-Lauf, nicht aber in der einzelnen Probe. Außerdem enthalten externe Kontrollen in der Regel keine bluteigenen oder zugesetzten Inhibitoren, wie z. B. Hämoglobin oder Heparin (Stöcher et al., 2002). Diese Inhibitoren können zu falsch-negativen Ergebnissen führen, d. h. das gesuchte Virus ist in der Patientenprobe vorhanden, kann aber nicht nachgewiesen werden. Die Anzahl der falsch-negativen PCR-Ergebnisse wird auf 0,3-1,1% bei Hepatitis B-Viren (HBV) (Drosten et al., 2000) und 2,5-3,4% bei *Herpes simplex*-Viren (HSV) und Varizella Zoster Viren (VZV) (Bezold et al., 2000) geschätzt. Zur Qualitätskontrolle werden mittlerweile interne Kontrollen von unabhängigen Qualitätsgutachtern gefordert, z. B. QCMD ([www.qcmd.org](http://www.qcmd.org)).

Die Sensitivität steigt um 1-6% beim Einsatz einer internen Kontrolle, wenn die Quote der falsch-negativen PCR-Resultate bei 5-9% liegt, wobei die Spezifität unverändert bleibt. Dies konnte für *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoe*, *Mycobacterium tuberculosis* und Hepatitis C-Virus (HCV) nachgewiesen werden (Rosenstrauss et al., 1998). Die Sensitivität steigt aus zwei Gründen: Zum einen, weil Wiederholungsmessungen der PCR möglich sind. Zum anderen, weil wiederholt gehemmte Proben als nicht auswertbar klassifiziert werden und damit aus der Sensitivitätsberechnung ausgeschlossen werden. Rosenstrauss und Kollegen konnten auch dokumentieren, dass 64% der falsch-negativen Proben bei Messwiederholungen positiv waren. Sie führten dies auf eine geringe Stabilität der Inhibitoren zurück (Rosenstrauss et al., 1998).

Besonders wichtig wird die interne Kontrolle, wenn die Wahrscheinlichkeit der Kontamination mit PCR-hemmenden Substanzen hoch ist, wie bei postmortalen Proben (Reiss und Rutz, 1999), oder wenn bei starkem klinischen Verdacht und negativem Resultat nicht beliebig häufig Verlaufskontrollen entnommen werden können, wie zum Beispiel bei Fruchtwasseruntersuchungen (Revello et al., 1997) oder Liquor.

Die interne Kontrolle belegt die Inhibition, kann sie aber nicht verhindern. Bei Inhibition kann man entweder ein anderes Aliquot derselben Probe untersuchen oder durch Verdünnung versuchen, die Inhibition zu entfernen (Courtney et al. 1999).

Es gibt die theoretische Überlegung, dass man die Hemmung genau berechnen könne, indem man eine bestimmte DNA-Menge der internen Kontrolle einsetzt und bei einem niedrigeren Ergebnis als erwartet die Hemmung quantifiziert. Die Überlegung beruht auf der Gleichung:

$$\boxed{K/T = K'*(1+E)^n / T'*(1+E)^n = K'/T'}$$

Hierbei repräsentiert K die Konzentration der kompetitiven internen Kontrolle nach der PCR, K' die eingesetzte Konzentration der internen Kontrolle vor der PCR, T die Targetkonzentration nach der PCR und T' die Targetkonzentration vor der PCR. E steht für die Effizienz der PCR, die bei der internen Kontrolle und dem Target gleich sein sollte, und n für die Anzahl der PCR-Zyklen (Boekh et al., 1998).

Eine genaue Berechnung der Inhibition ist aber auch mit dieser Formel nicht möglich, sie stellt nur eine Schätzung dar (Hoorfar et al., 2004). Die Formel ist nur bei gleicher Amplifikationseffizienz genau. Da sich die zu untersuchenden Viren von der internen Kontrolle um mindestens ein Merkmal (z. B. Schmelztemperatur, Länge oder Sonden) unterscheiden müssen, damit sie zu differenzieren sind, ist die Effizienz in der Regel nur annähernd gleich. Schließlich findet immer eine gegenseitige Beeinflussung zwischen der internen Kontrolle und dem Target statt. Dies kann durch die Konkurrenz um Nukleotide und DNA-Polymerase zur Abschwächung des Target-Nachweises, aber auch zur Verstärkung führen (Long et al., 2008). So kann nur von einer Teilinhibition gesprochen werden, wenn die interne Kontrolle deutlich schwächer erscheint als der erwartete Wert, oder von einer kompletten Inhibition, wenn sie nicht nachweisbar ist.

### 1.2.3 Inhibitoren der PCR

Blut ist als PCR-hemmend bekannt; schon geringste Mengen (ab 0,004% (vol./vol.)) Blut im PCR-Ansatz reichen für eine vollständige Inhibition der Taq-Polymerase aus. Dabei erweisen sich sowohl Plasma- als auch Thrombozyten- und Erythrozytenbestandteile als störend (Al-Soud et al., 2000).

Im Plasma konnte Immunglobulin Gamma (IgG) als Inhibitor identifiziert werden. Die unterdrückende Eigenschaft von IgG auf die PCR beruht wahrscheinlich auf der Bindung des IgG mit Einzelstrang-DNA (ssDNA), so dass die DNA-Polymerase nicht an die DNA binden kann (Al-Soud et al., 2000).

Bei dem Hemmstoff aus Erythrozyten handelt es sich hauptsächlich um Hämoglobin und bei Leukozyten, um Laktoferrin (Al-Soud und Rådström, 2001). Hämoglobin, Myoglobin und Laktoferrin ist gemeinsam, dass sie Eisenionen freisetzen können, worauf ein Teil ihrer hemmenden Wirkung beruht. Auch das Abbauprodukt Bilirubin besitzt noch diese hemmenden Eigenschaften. Ein anderer Teil der Inhibition beruht vermutlich auf einer direkten negativen Rückkopplung der Häm-Gruppe auf die DNA-Polymerase-Aktivität.

Dies konnte zumindest an DNA-Polymerasen verschiedener Zellkulturen gezeigt werden (Al-Soud und Rådström, 2001).

Des Weiteren sind die Antikoagulantien EDTA und Heparin, mit denen die meisten Blutproben versetzt werden, inhibitorisch wirksam (Al-Soud et al., 1999). Bei Heparin entsteht diese Wirkung vermutlich durch Interaktion mit DNA. Da beide Moleküle negativ geladen sind, kommt es wohl zu einer indirekten Beeinflussung, an der z. B. positive Magnesiumionen beteiligt sind (Satsangi et al., 1994). Auch bei EDTA kommt es zur Chelatbildung mit Magnesiumionen (Al-Soud und Rådström, 2001). Magnesiumionen werden zur Erhöhung der DNA-Polymerase-Aktivität zum sogenannten Mastermix hinzugefügt.

Chemikalien, die zur DNA-Extraktion eingesetzt werden, wie z. B. Ethanol und Natriumdodecylsulfat, sind ebenfalls starke Inhibitoren der PCR (Hodgson et al., 2007; Burggraf et al., 2004).

Auch Medikamente, wie aktive Metabolite von Aciclovir und Ganciclovir, können die Taq-Polymerase hemmen (Yedidag et al., 1996). Diese Pharmaka werden unter anderem bei der Therapie und Prophylaxe von CMV eingesetzt. Solche Virustatika führen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch bei der DNA-Synthese und binden die unfertige DNA-Kette an die DNA-Polymerase. Dieser Mechanismus funktioniert auch noch bei der PCR und kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Besonders häufig wird diese antivirale Therapie gegen CMV bei immunsupprimierten Patienten nach einer Organtransplantation oder mit Aids-Erkrankung verordnet. Gerade bei diesen Patienten ist jedoch ein zuverlässiges Ergebnis für Therapieentscheidungen notwendig (Yedidag et al., 1996; Niesters, 2002).

Durch die Entwicklung von automatischen DNA-Extraktionsverfahren mit Silikonmembran und magnetischen Teilchen konnte die Extraktion von DNA verbessert werden und weniger Inhibitoren werden bei der aufgereinigten DNA nachgewiesen (Petrich et al., 2006)

## **1.2.4 Verschiedene Methoden der internen Kontrolle**

Es lassen sich drei Hauptmethoden bei der internen Kontrolle unterscheiden: Dies ist zum einen die Verwendung von sogenannten *housekeeping* Genen, die für den basalen Zellmetabolismus benötigt werden und in ihrer Konzentration als konstant angesehen werden. Zum zweiten werden Plasmide für die interne Kontrolle synthetisiert, die bei entsprechenden Bindungsstellen für verschiedene Primer auch für unterschiedliche Viren

verwendet werden können. Und als dritte Möglichkeit kann man ein vollständiges Virus als interne Kontrolle verwenden.

## 1.2.4.1 Housekeeping Gene

*Housekeeping* Gene sind in allen eukaryotischen Zellen vorhanden und sichern deren Überleben, da die von ihnen kodierten Proteine für den basalen Zellmetabolismus verantwortlich sind. Die Synthese der für die Translation notwendigen mRNA wird als konstant angesehen und als Kontrolle mit den gesuchten Genen aufgearbeitet. Insbesondere bei der reversen Transkription von RNA-Viren werden die *housekeeping* Gene als interne Kontrolle nachgewiesen. Der Vorteil ist, dass diese Gene von Anfang an in jeder Probe vorhanden sind, also nicht produziert werden müssen, und so jeden Schritt der PCR kontrollieren. Häufig verwendet wird die mRNA von  $\beta$ -Aktin, Gluceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH) oder des ribosomalen Proteins L32 (Thellin et al., 1999). Blutbestandteile könnten ähnlich den *housekeeping* Genen in Patientenproben genutzt werden (Sachadyn et al., 1998).

Die Annahme, dass die Transkription von *housekeeping* Genen konstant ist, stimmt nur bedingt. So konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA-Konzentration in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus schwankt. Dies ist in anderen zusätzlichen Funktionen der synthetisierten Proteine außerhalb des basalen Zellmetabolismus begründet. Um Fluktuationen auszugleichen, eignet sich die Bestimmung von zwei *housekeeping* Genen und die Bildung eines Quotienten, wie zum Beispiel L32/G3PDH (Thellin et al., 1999).

Als zuverlässiger, da konstant gebildet, hat sich der Nachweis von 18s-RNA und 28s-RNA erwiesen. Trotzdem kann man Ergebnisse von verschiedenen Zelltypen oder von verschiedenen Versuchsbedingungen schwer vergleichen. *Housekeeping* Gene als interne Kontrolle sind für Patientenproben ungeeignet, da die Patienten-bedingten Eigenschaften, wie Alter und Geschlecht, stark differieren. Außerdem werden diese Gene während einer Lagerung leicht zerstört und erscheinen dann falsch-negativ (Thellin et al., 1999; Vallentin-Thon, 2002).

## 1.2.4.2 Plasmide und Oligonukleotide

Als interne Kontrolle werden am häufigsten Plasmide genutzt (Stöcher und Berg, 2002; Burggraf et al., 2004; Hodgson et al., 2007; Jothikumar et al., 2009). Plasmide haben den

Vorteil, dass sie lange Zeit stabil sind. Ihre Konzentration lässt sich gut regulieren, und sie lassen sich einfach konstruieren (Hoorfar et al., 2004).

Die einfachste Methode zur Herstellung eines solchen Plasmids ist, die Virussequenz des Targets zu verwenden und diese durch Insertion, Deletion oder Mutation zu verändern. Unterschieden werden können Target und interne Kontrolle über ihre Länge oder verschiedene Sonden (Courtney et al., 1999; Hodgson et al., 2007).

Diese Plasmide haben bei gleichen Primerbindungsstellen den Vorteil, dass sie dem Target durch die Ähnlichkeit in der Amplifikationseffizienz am nächsten kommen, da die Primer-Anlagerung einer der kritischen Schritte der PCR ist (Rosenstrauss et al., 1997).

Stöcher, Leb und Kollegen konstruierten Plasmide als universelle interne Kontrolle (Stöcher und Berg, 2002; Stöcher et al., 2003; Stöcher et al., 2004). Sie fügten in ein Plasmid vom Neomycin Phosphotransferase Gen die Primerbindungsstellen von EBV, CMV, HBV, VZV, HSV Typ 1 und 2 ein. Durch die Abfolge der Primerbindungsstellen wurden die Amplifikate den verschiedenen Targetlängen angepasst, was eine Bevorzugung bei der Amplifikation verhindern soll. Die Differenzierung von Target und interner Kontrolle erfolgt durch verschiedene FRET-Sonden (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Sonde).

Trotz all dieser Vorteile, haben Plasmide als interne Kontrolle auch Nachteile. Plasmide, die durch einen veränderten DNA-Abschnitt des humanpathogenen Virus entstanden sind, haben den Nachteil, dass sie nur für dieses eine Virus verwendet werden können. Haben interne Kontrolle und Target die gleichen Primerbindungsstellen, konkurriert die interne Kontrolle mit dem Targetgen nicht nur um Nukleotide und Enzyme, sondern auch um die Primer. Dies kann die PCR-Effizienz des Targetgens vermindern. Die gewollte Ähnlichkeit zum Targetvirus kann auch Probleme verursachen, wie die Entstehung von heteroduplexen Anlagerungen oder die Gefahr der Kontamination durch die Plasmide, wenn die Unterscheidung zwischen interner Kontrolle und Target nicht funktioniert (Sachadyn et al., 1998; Hoorfar et al., 2004). Nachteilig ist auch, dass Plasmide als interne Kontrolle nicht die Extrahierung und Aufreinigung der DNA kontrollieren (Picard et al., 2009). Hier schlagen Forschungsgruppen die zusätzliche Verwendung von *housekeeping* Genen vor (Stöcher und Berg, 2002; Stöcher et al., 2003; Stöcher et al., 2004; Leb et al. 2004).

Synthetische Oligonukleotide sind den Plasmiden als interne Kontrolle ähnlich. Sie besitzen den Vorteil, dass sie kommerziell und weniger zeitaufwendig hergestellt werden können, dafür aber auch teurer sind. Sie bestehen aus denselben Primerbindungsstellen wie



das Target, einer Bindungsstelle für die gleichen Sonden und einigen zusätzlichen Nukleotiden. Die Unterscheidung erfolgt durch verschiedene Schmelztemperaturen der Sonden. Durch Einbau von nicht übereinstimmenden Basenabfolgen (Mismatch) wird die Schmelztemperatur für die interne Kontrolle um 5°C gesenkt (Burggraf et al., 2004). Ein wesentlicher Nachteil besteht hier, dass keine quantitative Bestimmung erfolgen kann, da die Unterscheidung allein über die Schmelztemperatur erfolgt. Außerdem sind diese internen Kontrollen Virus-spezifisch und nicht universell einsetzbar.

### 1.2.4.3 Vollständige Viren

Die Vorteile von vollständigen Viren als interne Kontrolle sind, dass die gesamte Prozessierung wie bei den *housekeeping* Genen kontrolliert werden kann. Damit kann mit einer Kontrolle sowohl die DNA-Extraktion als auch die PCR auf Inhibition und Fehler bei den einzelnen Schritten überwacht werden.

Da ein Vollvirus in definierten Mengen hinzugefügt wird, ist die Methode standardisierbar und, im Gegensatz zu *housekeeping* Genen, nicht von Zellzyklus oder Lagerung der Patientenproben abhängig. Ein weiterer Vorteil ist, dass ein Virus als universelle Kontrolle verwendet werden kann. Dies ist besonders bei immunsupprimierten Patienten wichtig, bei denen häufiger multiple Infektionen diagnostiziert werden. Bei einer universellen Kontrolle muss nur einmal die interne Kontrolle zur Patientenprobe hinzugefügt werden.

Wichtig ist, dass das Kontrollvirus nicht humanpathogen ist und somit die Diagnostikergebnisse nicht verfälschen kann. Auch sind Kontaminationen wie bei der Herstellung von Plasmiden weniger wahrscheinlich. Es ist einfach in Zellkulturen zu züchten und bedarf wenig zusätzlicher Arbeitsschritte. Je nach Virusart kann ein DNA-Virus oder ein RNA-Virus als interne Kontrolle verwendet werden. Für das Kontrollvirus bedarf es eigener Primer und Sonden, deren Marker sich im Absorptionsspektrum von den Sonden des humanpathogenen Virus unterscheiden. Es wird angenommen, dass sich Virus-DNA zu Virus-DNA in der PCR ähnlicher verhält als zu Plasmid-DNA (Preiser et al., 2003). Der zu amplifizierende Abschnitt auf der Kontrollvirus-DNA sollte der Target-DNA in Guanin-Cytosin-Gehalt (GC-Gehalt), Schmelztemperatur und Länge gleichen, damit eine möglichst ähnliche Amplifizierungseffizienz erreicht wird (Hodgson et al., 2008; Hoorfar et al. 2004). Hubert Niesters hat dafür erfolgreich das Seehundvirus *Phocine Herpes Virus* Typ 1 als Kontrolle für DNA-Viren verwendet. Allerdings ist es bisher nur als zusätzlicher PCR-Ansatz publiziert, um das Originalresultat für die Diagnostik nicht zu beeinflussen (Niesters, 2002 und 2004; Stánská, 2004). Auch das murine Cytomegalievirus

wurde schon erfolgreich als interne Kontrolle für das humane Cytomegalievirus eingesetzt; die Detektion erfolgte hier mit einem Enzym-gebundenen Oligonukleotid Assay (Preiser et al., 2003).

## 1.3 Baculovirus

### 1.3.1 Struktur und Klassifikation der Baculoviren

Insektenviren sind nach gängiger Lehrmeinung gleichzeitig mit den Insekten vor ca. 350 Millionen Jahren als Ko-Evolution entstanden. Eine große Gruppe stellen die Baculoviren dar, die zum ersten Mal als „kristalline, vielflächige Einschlusskörperchen“ im Zusammenhang mit der Welkerkrankung der Seidenraupe im 18. Jahrhundert beschrieben wurde (Friesen und Miller, 2001). Baculoviren wurden nach ihren stabförmigen Nukleokapsiden benannt (lateinisch: *baculum* = Stab, Stock). Dieses Kapsid ist 50-300 nm lang und misst im Durchmesser 30-60 nm (Friesen und Miller, 2001).

Die Baculoviren können über 500 verschiedene Arten von Insekten der Klassen *Lepidoptera*, *Hymenoptera* und *Dipetera* befallen und werden meistens nach der Insektenart benannt, aus der sie erstmalig isoliert wurden. *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) wurde erstmals aus der Gammaeulenart *Autographa californica* isoliert, infiziert aber mehr als 30 verschiedene *Lepidoptera*-Arten (Friesen und Miller, 2001).

Es existieren zwei Subklassen der Baculoviren, die sich in ihren Virionen unterscheiden.

Eine Unterklasse sind die *nucleopolyhedrosis viruses* (NPV), die in ihrer langlebigen *occluded* Virusform die Virionen in eine Polyhedrinmatrix verpacken. Hier gibt es noch einmal zwei Unterformen: Die erste umhüllt ihre Virionen einzeln (*single nucleopolyhedrosisvirus* = SNPV); die andere fasst mehrere Virionen (über 20) in eine Polyhedrinmatrix (*multiple nucleopolyhedrosisvirus* = MNPV) zusammen (Murphy et al., 2004; Okano et al., 2005). Letztere sind dann im Durchmesser mehrere Mikrometer groß.

Die andere Subklasse wird als *granuloviruses* (GV) bezeichnet und kommt ausschließlich bei den *Lepidoptera*-Arten vor. Ihre Virionen werden einzeln von einer eiförmigen Granulinkapsel umschlossen. In ihrer Gesamtheit erscheinen sie dann im Lichtmikroskop als granuläre Struktur (Murphy et al., 2004; Okano et al., 2005).

## 1.3.2 Genom und Proteine

Das Genom der Baculoviren ist je nach Art unterschiedlich groß und reicht von 82-180 kb und kodiert für 90-180 Gene; das AcMNPV-Genom ist beispielsweise ca. 130 kb groß. Die unterschiedliche Größe erklärt sich durch die mehrfache Wiederholung von Genen, aber auch dadurch, dass die DNA von Wirtsinsekten und anderen Viren in das Genom integriert wird (Hernoui et al., 2001; Okano et al., 2005). Die DNA ist doppel-strängig und zirkulär angeordnet.

Das Genom des AcMNPV umfasst acht *homologous region sequences* (hrs). Diese bestehen aus je einer nicht-kodierenden 70 Basenpaaren (bp) großen Sequenz mit einem imperfekten 30 bp großen Palindrom (Friesen und Miller, 2001).

Die Strukturproteine Granulin und Polyhedrin sind eng verwandte, hochkonservierte Proteine und zeigen so jeweils eine Übereinstimmung von bis zu 46% der Aminosäuren. Sie schützen die Virionen bei der Infektion zwischen zwei Wirten vor schädlichen Umwelteinflüssen (Friesen und Miller, 2001; Okano et al., 2005).

Zur Fusion mit der Plasmamembran nicht-infizierter Wirtszellen wird das *envelope fusion protein* (EFP) gp 64 oder das *envelope fusion protein* LD 130 (auch F-Protein genannt) benötigt. Beide Proteine modifizieren beim Knospen des Baculovirus die Plasmamembran. *Hymenoptera*-Viren besitzen kein EFP-Gen, deswegen können sie nur den Mitteldarm infizieren und sind nicht zu einer systemischen Infektion fähig (Friesen und Miller, 2001; Hernoui et al., 2001; Murphy et al., 2004; Okano et al., 2005) .

## 1.3.3 Infektionszyklus

Bei den NPV-Baculoviren existieren biphasisch während des Infektionszyklus zwei verschiedene Infektionswege.

Die *occluded virus*-Form (OV) ist die primäre Infektionsform, mit der das Virus von Wirtsorganismus zu Wirtsorganismus übertragen wird. Die Infektion der Insektenlarven erfolgt durch Fressen von Blättern, an denen die verkapselten Viren anhaften. Im alkalischen Milieu des Mitteldarms der Insekten wird die Polyhedrinmatrix aufgelöst und *occlusion-derived virions* (ODV) werden freigesetzt. Diese infizieren die Epithelzellen des Mitteldarms, indem sie mit der Mikrovillimembran fusionieren. Die Nukleokapside werden in das Zytoplasma freigesetzt und wandern zu dem Zellkern (Friesen und Miller, 2001; Murphy et al., 2004; Okano et al., 2005; Peng et al., 2010).



In der sehr späten Phase verbleiben die Nukleokapside dagegen im Zellkern, werden umhüllt und in die Polyhedrinmatrix eingebettet. Sie werden während der Zelllyse des Wirtes als *occluded virus* wieder freigesetzt (Friesen und Miller, 2001; Rosinski et al., 2002; Murphy et al, 2004; Okano et al., 2005).

### 1.3.5 Transkription

Initiiert wird die Transkription durch die Wirts-RNA-Polymerase II, die den *early gene promoter* des Baculovirus erkennt, der den zellulären Promotern ähnlich ist. Die Transkription wird verstärkt durch *homologous region sequences* und Transkriptions-Transaktivatoren (Okano et al., 2005).

Die in der frühen Phase gebildete viruseigene RNA-Polymerase exprimiert anschließend Gene, die unter der Kontrolle des *late gene promoter* stehen.

In der sehr späten Transkriptionsphase werden die Strukturproteine Polyhedrin und p10 in sehr großen Mengen exprimiert. Für dieses hohe Expressionslevel sorgt eine AT-reiche Sequenz, die auch *burst sequence* genannt wird. Mit ihr interagiert der Transkriptionsaktivator *very late expression factor 1* (VLF-1) (Okano et al., 2005).

### 1.3.6 Baculoviren in der Biotechnologie

Baculoviren, insbesondere *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), konnten ab 1960 in Zellkulturen vermehrt werden. Ab 1973 waren *Plaque Assays* möglich, und seit Mitte der 1970er erfolgten die ersten Versuche mit Baculovirus-DNA als Transfervektor (Friesen und Miller, 2001; Arif, 2005).

Die Baculovirus-DNA des AcMNP-Virus eignet sich gut als Transfervektor, da die Baculovirus-DNA durch ihre eigene Größe (ca. 130 kbp) große Fremd-DNA-Stücke aufnehmen kann und hocheffizient ist. Zum anderen erfolgt die Expression der Proteine in eukaryotischen Insektenzellen, die von der posttranslationalen Modifikation und der Proteinfaltung Säugetierzellen gleichen. Dadurch sind die Proteine nutzbar für Struktur- und Funktionsstudien oder für die Impfstoffentwicklung. Es findet zudem eine außergewöhnlich hohe Produktion von biologisch aktiven Fremdproteinen statt (Friesen und Miller, 2001; Murphy et al., 2004).

Möglich ist die Nutzung von Baculoviren als Transfervektor, da sie zum Überleben und Infizieren anderer Zellen in Zellkulturen die Polyhedrinmatrix nicht benötigen (Friesen und Miller, 2001; Murphy et al., 2004).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Implementierung einer internen Kontrolle, die auf AcMNP-Virus beruht und für die PCR-Diagnostik von humanpathogenen DNA-Viren verwendet werden soll.

1. Dazu ist zunächst der Aufbau einer Baculovirus-PCR als Multiplex-Echtzeit-PCR notwendig. Es muss hierfür eine Sequenz sowie Primer und Sonden ausgewählt werden. Da die interne Kontrolle der jeweiligen virusspezifischen PCR zugefügt und als Multiplex-PCR erfolgen soll, ist eine Optimierung der Temperatur und des Mastermix nicht möglich. Die Amplifikation der Baculovirus-DNA muss bei nicht optimierten Bedingungen hinreichend gut erfolgen können.
2. Die Sensitivität und Spezifität der PCR humanpathogener Viren soll selbst bei geringen Viruslasten nicht beeinträchtigt werden. Das Baculovirus muss im Zweifelsfall schlechter amplifiziert werden, da ein Verlust oder Unterdrückung des humanpathogenen Virus die eigentliche Diagnostik stören würde.
3. Des Weiteren ist eine möglichst lange Lagerungsstabilität der internen Kontrolle zu erreichen, um zur Vereinfachung des Arbeitsprozesses beizutragen. Ein Verlust der Baculovirus-DNA bei zu langer Lagerung würde die Quantifizierung beeinträchtigen, da zu niedrige Standardwerte gemessen würden.
4. Die interne Kontrolle soll ohne großen zusätzlichen Arbeitsaufwand ermöglicht werden. So sollen z. B. die Ansätze nicht jeden Tag erneuert werden müssen und in einem automatisierten Verfahren hinzugegeben werden. Überdies soll dieses Ziel durch die Verwendung einer Multiplex-PCR erreicht werden, so dass nur ein PCR-Lauf notwendig sein wird. Arbeitsressourcen sollen somit geschont werden.

## 2 Methoden

### 2.1 Manuelle Extraktion von Nukleinsäuren

Für die manuelle DNA-Extraktion wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (NucleoSpin Blood-Kit von Machery-Nagel), das für die DNA-Isolierung aus Zellkulturen, Vollblut, Serum, Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten geeignet ist. Die DNA wurde hierbei über Anionenaustausch an kleinen Silikatsäulen gebunden, die nach jeder Zentrifugation in ein neues Auffangröhrchen gestellt wurden. 200 µl der jeweiligen Probe wurden mit Proteinkinase K und dem Lysispuffer B3 für 10 Minuten bei 70°C inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf). Dabei wurden alle Zellstrukturen und Proteine zerstört. Das anschließend dazugegebene *Ethanol absolut* (210 µl, AppliChem) verbesserte die reversible Bindungsfähigkeit der DNA an die Silikat-Membran. Die Säulen wurden 1 min lang bei 14.000 rpm zentrifugiert (Laborzentrifuge 1K15, Sigma). Dann wurden 500 µl Waschpuffer BW hinzupipettiert (Pipetman, Gilson; gestopfte Pipettenspitzen, Greiner) und bei 14.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Als zweiten Waschpuffer wurden 600 µl B5 hinzugegeben und bei 14.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die beiden Waschpuffer BW und B5 lösten während der Zentrifugation alle unerwünschten Bestandteile aus der Membran heraus. Zuletzt wurde die DNA mit 100 µl 70°C-warmem Elutionspuffer BE aus der Silikat-Membran gelöst. Dies geschah wiederum bei einer Zentrifugation von 14.000 rpm für 1 min in einen frischen Reagenzbehälter (Reagiergefäße 1,5ml, Sarstedt) (Gebrauchsanleitung NucleoSpin Blood-Kit, 2006).

### 2.2 Automatische Extraktion von Nukleinsäuren

Mit dem Automat (MagnaPure LC, Roche) können die Nukleinsäuren von bis zu 32 Proben mit Hilfe von magnetischen Partikeln isoliert werden. Für den Betrieb des Automaten wird das dazugehörige Kit mit verschiedenen Puffern (MagnaPure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche) und den passenden Reagenzgefäßen (MagnaPure Reagenzgefäße, Roche) benötigt.

Eingesetzt werden 200 µl einer Probe, zum Beispiel Zellkulturüberstände, Vollblut, Serum, Plasma oder andere Körperflüssigkeiten. Der Zusatz von Antikoagulantien oder ein vorheriges Tieffrieren der Proben beeinflusst diese Methode nicht (Deggerdal und Larsen, 1997).

Zuerst wurde den Proben ein Lysis- und Bindungspuffer zugesetzt, der die Zellbestandteile zersetzte und die Nukleinsäure freisetzte. Mit der danach folgenden Proteinkinase K wurden die Proteine verdaut. Anschließend wurde Guanidinhydrochlorid hinzupipettiert, das Zellen lysierte, Proteine denaturierte und dadurch Nukleasen inaktivierte. Das enthaltene Isopropanol erhöhte die reversible Bindungsfähigkeit durch Anionenaustausch der DNA und RNA an der Silikat-Oberfläche der magnetischen Partikel. Die Partikel mit den gebundenen Nukleinsäuren wurden nach jedem Waschschrte magnetisch in den Pipettenspitzen zurückbehalten und die Waschlösungen konnten verworfen werden. Die DNA wurde im letzten Schritt mit 70°C warmem Elutionspuffer von den Partikeln gelöst und bei 4°C bis zur Entnahme aufbewahrt (Kessler et al., 2001; Deggerdal et al., 1997).

### 2.3 Gelelektrophorese

Für die DNA-Trennung und DNA-Identifizierung wurde ein 2% Agarosegel hergestellt. Dafür wurden 2 g Agarose Pulver (SeaKem LEAgarose, Biozym) in 100 ml TAE-Puffer (eigene Herstellung: 242g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 37,2 g EDTA, 57,1 ml Essigsäure, vollentsalztem-Wasser) gelöst. Hierzu musste das Gemisch in der Mikrowelle (Panasonic Pro II 1400, Masushita Electric Industrial) erhitzt werden. Nach dem Abkühlen wurden 9 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml, Sigma) hinzugegeben. Das Gel wurde in eine dafür vorgesehen Form (Mini Sub Cell GT bzw. Sub Cell GT, Biorad) gegossen. Schließlich wurde ein Kamm zur Erzeugung von Geltaschen in das Gel gesetzt und das Aushärten des Agarosegels abgewartet.

Das in der Form befindliche Agarosegel wurde in eine Elektrophoresekammer eingebracht und mit TAE-Puffer überschichtet.

10 µl des Amplifikats wurden mit 2 µl Loading Dye (6-fach Mass Loading Dye, Fermentas) gemischt und von der Mischung wurden 10 µl in eine Geltasche gefüllt. 5 µl Basenleiter (100 bp ladder, GeneRuler, Fermentas) wurden in eine freie Tasche hinzugefügt. Das Netzgerät (Biorad, power pac 300) wurde auf 100 mV eingestellt; die Spannung wurde so lange belassen, bis sich die DNA-Banden nach Größe differenzieren ließen. Das Ethidiumbromid interkalierte zwischen der doppelsträngigen DNA und fluoreszierte bei UV-Licht (MultiImage Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation). Zur Dokumentation wurde das Gel anschließend fotografiert (Leica).



### 2.4 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur *in-vitro* Vervielfältigung von doppelsträngiger DNA. Zunächst werden die beiden DNA-Stränge durch Erhitzen auf 95°C denaturiert und somit in ihre Einzelstränge aufgespalten. Im Annealingsschritt lagern sich bei 55-58°C die Primer an. Primer sind Oligonukleotide, die komplementär zum amplifizierenden Strang aufgebaut sind und dessen Enden definieren. Benötigt werden zwei verschiedene Primer als Ausgangspunkt für DNA-Synthese. Es folgt bei 72°C der Elongationsschritt, bei dem die Taq-Polymerase beginnend an den Primern den neuen DNA-Strang aus einzelnen Nukleotiden komplementär zu dem vorhandenen DNA-Strang synthetisiert. Danach erfolgt wieder die Denaturierung und ein neuer Zyklus. Es werden 30-45 Zyklen benötigt, um eine ausreichende Menge an DNA zu amplifizieren.

Die Echtzeit-PCR beruht auf dem Prinzip der PCR und quantifiziert kontinuierlich die amplifizierte DNA-Menge durch Fluoreszenzmessung. Es wird ein Automat (LightCycler, Roche) verwendet, der gleichzeitig 32 Proben amplifizieren kann und die gemessene Fluoreszenz mittels Computerprogramm grafisch darstellt und auswertet (Wittwer et al., 1997).

In speziellen Glaskapillaren (LightCycler Capillaries 20 µl, Roche) werden 10-20 µl Mastermix und isolierte DNA pipettiert und die Probe mit einer Zentrifuge (LightCycler Centrifuge, Roche) in die Kapillare bei 3.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert (Wittwer et al., 1997). Als Mastermix wird der Ansatz aus Primern, Sonden, Polymerase, Nukleotiden, Magnesium, bovines Serumalbumin und ggf. Dimethylsulfoxid (DMSO) bezeichnet, der zur jeder Probe für die PCR hinzugegeben wird.

Erhitzt und gekühlt werden die Proben mit Luft, die mit einem Ventilator gleichmäßig im Innenraum des Automaten verteilt wird. Da die Oberfläche der Kapillaren im Verhältnis zum Inhalt relativ groß ist, kann ein schneller Temperaturwechsel von bis zu 20°C/Sekunde stattfinden. Ein Motor lässt das Karussell, in dem die Kapillaren stehen, um seine eigene Achse rotieren, so dass jede Probe vom Detektor erfasst wird (Wittwer et al., 1997).

Zur Detektion der DNA werden fluoreszenz-markierte Sonden verwendet. Diese werden mit einer Leuchtdiode, die eine Wellenlänge von 470 nm abstrahlt, einmal pro Zyklus am Ende der Annealing-Zeit angeregt. Das Licht fällt von unten auf die Kapillarenspitze, so dass ein paraxialer Lichtstrahl durch die Kapillare fällt. Die Messung dauert 100 ms pro Kapillare (Wittwer et al., 1997). Der zurückgeworfene Lichtstrahl passiert einen Farbfilter,

bevor er durch Dioden analysiert wird. Eine Silikonphotodiode misst im ersten Kanal bei 530 nm die zurückgesendete Strahlung von SYBR green II. Die Dioden der Kanäle zwei und drei messen die emittierte Strahlung von Hybridisierungssonden bei 640 nm bzw. 705 nm. Bei einer entsprechend unterschiedlichen Markierung können in den beiden Kanälen zeitgleich zwei verschiedene Signale empfangen werden. Ein Farbkompensations-Programm (LightCycler Color Compensation Set, Roche) korrigiert Spektralüberlappungen (Wittwer et al., 1997; von Ahsen et al., 2000).

Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden sind Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer-Sonden (FRET-Hybridisierungssonden, TIB Molbiol), die aus spezifischen komplementären Oligonukleotiden bestehen. Die erste Sonde ist am 3'-Ende mit einem Fluorochromfarbstoff (Donor) markiert, die zweite Sonde am 5'-Ende mit einem Akzeptor markiert. Beide Sonden müssen mit einem Abstand von 1 bis 3 Basenpaaren bzw. 10-100 Å an die einzelsträngige DNA binden. Wird über die Diode die Donorsonde angeregt, so gibt sie die Energie an die Akzeptorsonde weiter, die die Strahlung in einem anderen Wellenlängenbereich emittiert. Die Energie wird, so vermuten die Autoren, über Hitze oder Dipolinteraktion weitergegeben (Wittwer et al., 1997; Mackay et al., 2002).

Steigt die Fluoreszenz über die Hintergrundstrahlung an, geht die Amplifikation in die exponentielle Vervielfältigungsphase über. Dieser Zyklus bzw. Punkt wird crossing point (cp) genannt und zu diesem Zeitpunkt wird auch die DNA-Konzentration bestimmt (Wittwer et al., 1997; Mackay, 2004).

Im letzten Schritt wird eine Schmelzkurve erzeugt, indem die Temperatur langsam ansteigt und die zugehörige Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wird. Die Fluoreszenz sinkt während des Temperaturanstiegs, da sich bei zunehmender Denaturierung die Sonden von der DNA lösen. Wenn die Hälfte der Sonden gelöst wurde, d. h. die Fluoreszenz auf die Hälfte gesunken ist, ist die Schmelztemperatur erreicht. Mit einer solchen Schmelzkurve können bei Fluoreszenz-Sonden Mutationen, die sich im Bereich der Sonden befinden, unterschieden werden (von Ahsen et al., 2000; Espy et al., 2006).

### 2.5 Auswahl der Baculovirussequenz

Für die Versuche wurde das Insektenvirus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) aus der Familie der Baculoviridae verwendet, im Verlauf als Baculovirus bezeichnet. Es ist nicht humanpathogen, gut beschrieben und lässt sich leicht kultivieren. Die Auswahlkriterien für die zu amplifizierende Sequenz des

Baculovirus waren eine ähnliche Länge und ein ähnlicher Guanin-Cytosin-Gehalt (GC-Gehalt), vergleichbar mit den Amplifikaten der humanpathogenen Viren. Es sollte dadurch verhindert werden, dass das Baculovirus bevorzugt in der Multiplex-PCR amplifiziert wird (Cone et al., 1992; Pham et al., 1998; Stöcher et al., 2002). Die Multiplex-PCR wurde nicht für das Baculovirus optimiert. Es wurden stattdessen die gegebenen Bedingungen, die sich für das humanpathogene Virus als ideal erwiesen haben, übernommen.

### **2.5.1 Länge und Guanin-Cytosin-Gehalt der Baculovirusamplifikate**

Die Amplifikate der humanpathogenen Viren unterschieden sich in ihrer Länge deutlich und lagen zwischen 185 bp bis 510 bp. Dies bedeutete eine Varianz von 325 bp bei einer durchschnittlichen Länge von 322,6 bp.

Um die Längenunterschiede zu minimieren, aber nicht für jedes Virus eine eigene interne Kontrolle konstruieren zu müssen, wurden die Amplifikate der humanpathogenen Viren in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfasste die Viren Herpes simplex-Virus, Parvovirus B-19 und Varizella-Zoster-Virus mit den kleinsten Amplifikatlängen von durchschnittlich 211 bp. Die zweite Gruppe mit einer mittleren Länge von 393 bp wurde von den Viren Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus und Humanes Herpesvirus 6 gebildet. Die letzte Gruppe enthielt allein das Hepatitis B-Virus mit einer Länge von 510 bp. Der Mittelwert der jeweiligen Gruppe war der Anhaltswert für die optimale Länge des Baculovirus-Amplifikats (s. Anhang Tabelle 7, Tabelle 8 und Tabelle 9).

Auch der GC-Gehalt des Zielgenoms bestimmt die Amplifikationseffizienz. Damit optimale Amplifikationsbedingungen für eine PCR vorliegen, wird der GC-Gehalt in der Literatur mit 40-60% angegeben. Er lag bei den vorgegebenen Viren zwischen 42-62% und durchschnittlich bei 50,5%. Auch die Baculovirus-Amplifikate sollten sich als Vorgabe in diesem Bereich befinden, um möglichst ähnliche Amplifikationsbedingungen herzustellen (s. Anhang Tabelle 7, Tabelle 8 und Tabelle 9).

### **2.5.2 Primer für die Baculovirus-Polymerase-Kettenreaktion**

Die Primer für das Baculovirus sollten eine Länge von 18-25 Basenpaare und einen GC-Gehalt von 40-60% sowie eine Schmelztemperatur zwischen 55-65°C aufweisen. Die Primer der humanpathogenen Viren hatten eine durchschnittliche Länge von 22,7 bp, einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 52% und ihre Schmelztemperatur betrug im Durchschnitt 63,3°C.

Mit Hilfe eines Computerprogramms (Oligonucleotide Properties Calculator, [www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)) wurde sichergestellt, dass die Primer des Baculovirus keine Haarnadelstrukturen ausbilden, die eine Bindung an den DNA-Strang behindern.

Außerdem durften die Primer des Baculovirus nicht an das humane Genom, das Genom der humanpathogenen Viren oder Zellkultur-Zellen binden. Auch eine Bindung der Primer untereinander oder mit Sonden würde die DNA-Amplifikation beeinträchtigen. Die Überprüfung, ob komplementäre Strukturen vorlagen, wurde mit dem Blast-Programm (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) durchgeführt.

### 2.5.3 Sonden für das Baculovirus-Amplifikat

Da die meisten Diagnostikprotokolle der Echtzeit-PCR mit Hybridisierungssonden arbeiten, wurden auch für das Baculovirus Hybridisierungssonden und kein anderer Sondentyp, wie z. B. TaqMan-Sonden oder Molecular Beacons, gewählt.

Die Sonden sollten 25-27 Basenpaare lang sein und für eine optimale Energieübertragung im Abstand von ein bis drei Basenpaaren auf dem DNA-Strang binden. Die Schmelztemperatur brauchte sich nicht von den Sonden der humanpathogenen Viren unterscheiden, da die Differenzierung der Amplifikate über verschiedene Wellenlängen der Sonden und nicht über die Schmelztemperaturanalyse stattfand.

Es war bei den Sonden wichtig zu vermeiden, dass sie an humanes Genom, anderem viralem Genom oder Resten von Zellkulturen binden. Bindungen an andere Primer oder Sonden und die Ausbildung von Haarnadelstrukturen mussten ebenfalls ausgeschlossen werden.

## 2.6 Bindungsselektivität der Primer und Sonden

### 2.6.1 Verdünnung und Quantifizierung der Baculovirusamplifikate

Extrahierte Baculovirus-DNA wurde mit Elutionspuffer sechsmal logarithmisch verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde für alle drei Amplifikatlängen nur einmal angesetzt und dann auf drei Aliquots aufgeteilt. Für jede Amplifikatlänge des Baculovirus wurde je ein Mastermix hergestellt, der sich durch die eingesetzten Antisense-Primer unterschied und so die verschiedenen Längen des Baculovirus-Amplifikats bestimmten (s. Anhang „Baculovirus mit Sonden“ 7.2.1). Folgende Kontrollen wurden mitgeführt und ersetzen das Probenmaterial: 5 µl *Aqua ad iniectabilia* (Braun) zur negativen Kontrolle, 5 µl

unverdünnter Baculovirus-Zellkulturüberstand zur positiven Kontrolle und 5 µl Baculovirus-Plasmid ( $10^9$  Kopien/Ansatz) zur Quantifizierung. Die Ansätze wurden mit Hilfe einer Echtzeit-PCR amplifiziert (Protokoll im Anhang 7.2.1) und anschließend wurden die Amplifikate in einem 2%-Agarosegel 45 min bei 100 mV elektrophoretisch getrennt (vgl. Abschnitt 2.3). Das Gel wurde anschließend fotografiert.

### **2.6.2 Bindungsselektivität der Primer und Sonden gegenüber humanem Genom**

Acht Patientenproben unterschiedlichen Ursprungs wurden ausgewählt, bei denen vorher eine Virusinfektion diagnostisch ausgeschlossen worden war. Dies waren einmal periphere Blutlymphozyten, eine broncho-alveoläre Lavage, zwei Pleurapunktate, zwei Urinproben und zwei Serum- bzw. Plasmaproben. Als Positivkontrolle wurde ein Baculovirus-Zellkulturüberstand verwendet und als Negativkontrolle *Aqua ad iniectabilia*.

Die DNA wurde mit Hilfe eines manuellen, kommerziell-erhältlichen DNA-Extraktionskits aufgereinigt (vgl. 2.1). Jedes der drei Primerpaare wurde in einem Echtzeit-PCR-Lauf an den acht Patientenproben und den positiven und negativen Kontrollen getestet. Es wurde für jedes Primerpaar ein PCR-Mastermix angesetzt, wobei sich immer nur der Antisense-Primer änderte. Die verwendeten Mastermixe entsprechen dem Ansatz „Baculovirus mit Sonden“ (s. Anhang 7.2.1), es wurde auch das dort aufgeführte PCR-Protokoll durchgeführt.

### **2.6.3 Bindungsselektivität der Primer und Sonden bei Zellkulturen und deren Überstände**

Um experimentell zu überprüfen, ob die Baculovirus-Primer und -Sonden nicht an Zellen der Zellkulturen binden, wurden folgende Zellkulturen und ihre Überstände in einer Echtzeit-PCR als Probe eingesetzt: Hela-Zellen, Vero-Zellen, Hep-Zellen und LLC MK2-Zellen. Die DNA der Zellkulturen wurde mit Hilfe des automatisierten Verfahrens (vgl. 2.2) extrahiert. Getestet wurden die Zellkulturen an fünf verschiedenen Mastermixen: an den drei Mastermixen, die die drei verschiedenen Baculoviruslängen amplifizieren (s. Anhang 7.2.1), dem „HSV mit Baculovirus“-Mastermix (s. Anhang 7.2.3) und dem „CMV mit Baculovirus“-Mastermix (s. Anhang 7.2.7). Der Mastermix „HBV mit Baculovirus“ wurde nicht getestet, da das Hepatitis B-Virus nicht in Zellkulturen gezüchtet werden kann, und deswegen die Ergebnisse nicht durch Zellkulturrückstände beeinflusst werden können. Es wurde der Echtzeit-PCR-Lauf „Baculovirus mit Sonden“ gewählt (s. Anhang 7.2.1).

Für die Positiv- und Negativkontrollen wurden die Mastermixe „Baculovirus mit HSV“, „Baculovirus mit CMV“ und der Mastermix „Baculovirus mit Sonde“ für das längste Baculovirus-Amplifikat verwendet (s. Anhänge 7.2.5, 7.2.7 und 7.2.1). Als Positivkontrollen wurden stark-positive Kontrollen von HSV, CMV und Baculovirus eingesetzt und für die Negativkontrollen *Aqua ad iniectabilia* anstelle einer Probe hinzugefügt.

### **2.6.4 Beeinträchtigungen der PCR durch den Baculovirus-Mastermix und das Baculovirus**

Um sicher zu stellen, dass weder die zusätzlichen Primer und Sonden des Baculovirus noch die Baculovirus-DNA die diagnostische PCR beeinträchtigen, wurde für die exemplarischen Viren HBV, HSV und CMV der hier beschriebene Versuch durchgeführt. Eine Verdünnungsreihe der entsprechenden Virus-DNA wurde einmal mit dem unveränderten Mastermix amplifiziert; einmal mit dem Mastermix, der zusätzlich die Baculovirus-Primer und -Sonden enthält, und einmal mit dem kombinierten Mastermix und zusätzlich der Baculovirus-DNA.

#### **2.6.4.1 HBV und Baculovirus**

Es wurde eine HBV-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen  $10^4$ ,  $10^3$  und  $10^2$  Kopien/ml angesetzt, jede Konzentration wurde dreifach getestet. 2,5 µl der isolierten HBV-DNA und 2,5 µl Puffer (10-fach PCR Puffer, Invitrogen) wurden mit dem Mastermix „HBV“ (s. Anhang 7.2.2) und dem dazugehörigen PCR-Protokoll amplifiziert. In der zweiten Gruppe wurden 2,5 µl der HBV-DNA mit 2,5 µl Puffer verdünnt und mit dem Mastermix „HBV mit Baculovirus“ angesetzt (s. Anhang 7.2.3), in dem neben den Primern und Sonden des Hepatitisvirus auch diejenigen des Baculovirus enthalten waren. In der dritten Gruppe wurden 2,5 µl der HBV-Verdünnungsreihe mit 2,5 µl einer Baculovirus-DNA-Verdünnung mit  $1,25 \times 10^2$  Kopien/Ansatz ( $2,5 \times 10^4$  Kopien/ml) zusammen mit dem Mastermix „HBV mit Baculovirus“ (s. Anhang 7.2.3) angesetzt. Die negative Kontrolle bestand aus 5 µl *Aqua ad iniectabilia*, die positive Kontrolle für das Baculovirus aus 5 µl Baculovirus-Verdünnung. Da die Verdünnungsreihe des HBV mit dem HBV-Mastermix schon alle Verdünnungsschritte kontrollierte, wurde auf eine Positivkontrolle für HBV verzichtet.

#### **2.6.4.2 HSV und Baculovirus**

Für das *Herpes simple*-Virus war der Versuch analog aufgebaut. Die Verdünnungsreihe umfasste die Konzentrationen von  $10^4$  bis  $10^2$  Kopien/ml aufgereinigter HSV-DNA in

Zehnerpotenzen. Jede Verdünnungsstufe wurde dreifach eingesetzt. Als erstes wurden 2,5 µl der HSV-Verdünnungsreihe und 2,5 µl 10-fach PCR-Puffer mit dem Mastermix „HSV“ angesetzt (s. Anhang 7.2.4). Die nächsten Proben bestanden aus 2,5 µl der HSV-Proben und 2,5 µl Puffer, die aber diesmal mit dem Mastermix „HSV mit Baculovirus“ amplifiziert wurden (s. Anhang 7.2.5), der sowohl Primer und Sonden des HSV als auch die des Baculovirus enthielt. Als letztes folgte die Gruppe, die aus 2,5 µl HSV-Proben und aus 2,5 µl aufgereinigte Baculovirus-DNA in der Verdünnungsstufe von 10 Kopien/Ansatz ( $2 \times 10^3$  Kopien/ml) bestand. Es wurde der Mastermix „HSV mit Baculovirus“ (s. Anhang 7.2.5) verwendet. Die Amplifikation erfolgte als Echtzeit-PCR mit dem PCR-Protokoll „HSV“ für alle drei Vergleichsgruppen (s. Anhang 7.2.4). Als Negativkontrolle wurden 5 µl *Aqua ad iniectabilia* und für die Positivkontrolle 5 µl Baculovirus-DNA Verdünnung verwendet. Eine positive Kontrolle für HSV wurde nicht verwendet, da die fünf Proben mit ausschließlich HSV-DNA und dem HSV-Mastermix als Positivkontrolle verwendet wurden.

### 2.6.4.3 CMV und Baculovirus

Auch die Verdünnungsreihe für die CMV-DNA wurde in den Konzentrationen  $10^4$ ,  $10^3$  und  $10^2$  Kopien/ml angesetzt, die Baculovirus-DNA enthielt 100 Kopien/Ansatz ( $2 \times 10^4$  Kopien/ml). Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde ein dreifacher Probenansatz gewählt und in den Gruppen, die keine Baculovirus-DNA enthielten, wurde dieses Volumen durch 2,5 µl 10-fach PCR-Puffer ersetzt. Das PCR-Protokoll entsprach dem, das mit dem CMV-Mastermix beschrieben ist (s. Anhang 7.2.6). In der ersten Verdünnungsreihe wurden 2,5 µl CMV-Verdünnung und 2,5 µl Puffer mit dem Mastermix „CMV“ angesetzt (s. Anhang 7.2.6). Die nächsten Proben bestanden aus 2,5 µl CMV-DNA mit 2,5 µl Puffer, die mit dem Mastermix „CMV mit Baculovirus“ (s. Anhang 7.2.7) amplifiziert wurden. Dieser Mastermix enthielt die Sonden und Primer des Cytomegalievirus und des Baculovirus. Die letzte Vergleichsgruppe setzte sich aus 2,5 µl der CMV-Verdünnungsstufen und 2,5 µl Baculovirus-DNA mit dem Mastermix „CMV mit Baculovirus“ (s. Anhang 7.2.7) zusammen. Die erste Verdünnungsreihe des CMV war gleichzeitig die Positivkontrolle des CMV, für das Baculovirus wurden 5 µl der Zellkulturüberstand-Verdünnung und zur negativen Kontrolle 5 µl *Aqua ad iniectabilia* eingesetzt.

### 2.7 Stabilität des Baculovirus

Um den Einsatz einer internen Kontrolle einfach und wenig arbeitsaufwendig zu gestalten, musste herausgefunden werden, wie lange sich die interne Kontrolle lagern lässt. Je länger die verlustfreie Lagerung, desto geringer ist der zusätzliche Arbeitsaufwand.

#### 2.7.1 Langzeit-Stabilität von Baculovirus-Zellkulturüberstand bei 4°C

Zunächst wurde überprüft wie lange sich Baculovirus-Zellkulturüberstand langfristig lagern lässt. Dazu wurde Baculovirus-Zellkulturüberstand in etwa 100 Aliquots zu je 250 µl aufgeteilt und diese im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. In den darauf folgenden Wochen wurden von Montag bis Freitag 200 µl von einem Aliquot entnommen und die DNA mit Hilfe des automatischen Extraktionsverfahrens isoliert (vgl. 2.2). Dies erfolgte nach Gebrauchsanleitung des Herstellers. Nach der DNA-Isolierung wurden die Proben bei -18°C tiefgefroren und freitags für die PCR bei Zimmertemperatur aufgetaut. Die PCR wurde mit den Primern für das große Baculovirus-Amplifikat (505 Basenpaaren) durchgeführt (Mastermix und PCR-Protokoll „Baculovirus mit Sonden“, s. Anhang 7.2.1). Der Versuch dauerte zehn Wochen mit insgesamt 47 Einzelproben.

#### 2.7.2 Kurzzeit-Stabilität bei unterschiedlichen Temperaturen

Das Baculovirus wurde bei diesem Versuch zur Lagerung dem Lysispuffer des automatischen DNA-Extraktionsverfahrens hinzugefügt und ein Teil bei Raumtemperatur und der zweite Teil bei 4°C gelagert. Dies hat den Vorteil, dass der Lysispuffer durch die lytische Wirkung auf DNasen die DNA stabilisiert. Außerdem sollte das Baculovirus später mit dem Lysispuffer auf alle Proben gleichmäßig und automatisch verteilt werden, um zusätzliche Arbeitsschritte zu vermeiden.

Für den Versuch wurden 49,56 ml Lysispuffer (Pipetus-Akku, Hirschmann; Glaspipetten, Darga; Plastik Auslaufpipetten, Sarstedt) aus dem Set der automatischen DNA-Extraktion (vgl. 2.2) mit 840 µl Baculovirus-Zellkulturüberstand mit einem Vortexer (Vortex Genie 2, Scientific Industries) vermischt. Am Tag des Ansatzes wurden 3,6 ml des Baculovirus-Lysispuffer-Ansatzes anstelle des regulären Lysispuffers in die Behälter der automatischen DNA-Extraktionsanlage gefüllt. Als Probe dienten, wie für jeden folgenden Tag, viermal 200 µl Insektenzellkulturmedium (TC 100-Zellkulturmedium). Dieser Tag 0 ist für beide Gruppen der Ausgangswert. Die verbliebenen 47,0 ml Lysispuffer wurden in zwei Ansätze mit je 23,5 ml in Plastikröhrchen (PP-Röhrchen, Greiner bio-one) aliquotiert. Der erste Ansatz wurde für insgesamt acht Tage im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und der zweite



Teil lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Am dritten Tag wurde begonnen, Insektenzellkulturmedium als vierfachen Ansatz mit dem Baculovirus-versetzten Lysispuffer aufzuarbeiten. Zunächst wurde nur der Lysispuffer verarbeitet, der im Kühlschrank gelagert wurde, und ab dem vierten Tag dann auch der bei Raumtemperatur gelagerte Lysispuffer. Die Proben wurden nach der DNA-Extraktion für die spätere Amplifikation bei -18°C im Tiefkühlschrank eingefroren. Für die Echtzeit-PCR wurde der Mastermix und das PCR-Protokoll „Baculovirus mit Sonden“ mit der großen Amplifikatlänge von 505 bp verwendet (s. Anhang 7.2.1). Als Negativkontrolle wurde *Aqua ad iniectabilia* verwendet, als Positivkontrolle Baculovirus-Zellkulturüberstand.

### 2.7.3 Reproduzierbarkeit des Baculovirus-Lysispuffer-Ansatzes

Um zu beweisen, dass die Stabilität des Baculovirus reproduzierbar ist, wurden vier gleiche Ansätze von Baculovirus-Zellkulturüberstand mit Lysispuffer hergestellt. Für jeden Ansatz wurden 7,08 ml Lysispuffer aus dem Kit des automatischen DNA-Extraktionsverfahrens mit 120 µl Baculovirus-Zellkulturüberstand versetzt und gemischt. Von diesen Lysispuffern wurden am selben Tag Aliquots entnommen und die DNA mit dem DNA-Isolationsautomat aufgereinigt (vgl. 2.2), um Ausgangswerte zu erhalten. Der Baculovirus-enthaltende Lysispuffer wurde nach Gebrauchsanleitung in der automatisierten Nukleinsäure-Extraktionsanlage verwendet. Als Probe wurden je Ansatz dreimal 200 µl Insektenzellkulturmedium eingesetzt. Die isolierte DNA wurde bei -18°C tiefgefroren. Acht Tage lang wurden anschließend die Aliquots mit Baculovirus-versetzten Lysispuffern im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Danach wurden die Lysispuffer unter denselben Bedingungen wie am ersten Tag in das automatische DNA-Isolationsgerät gegeben. Als Probe fungierten wieder je 3 Proben à 200 µl Zellkulturmedium. Auch diese Proben wurden bei -18°C bis zur PCR tiefgefroren. Alle Proben aus der Versuchreihe wurden in einem Echtzeit-PCR-Lauf amplifiziert. Für die PCR wurde der Mastermix und das PCR-Protokoll „Baculovirus mit Sonden“ mit der großen Amplifikatlänge (s. Anhang 7.2.1) benutzt. Für die negative Kontrolle wurde 5 µl *Aqua ad iniectabilia* eingesetzt und als positive Kontrolle 5 µl unverdünnter Zellkulturüberstand des Baculovirus.

## 2.8 Herstellung einer Standardkurve für das Baculovirus

Um eine Standardkurve für das Baculovirus zu erzeugen, mit der Baculovirus-Konzentrationen in der Echtzeit-PCR quantifiziert werden können, wurden Baculovirus-Plasmide hergestellt. Dazu wurde mit einem kommerziellen Klonierungs-Kit (Topo TA

Kloning Kit, Invitrogen) der längste zu amplifizierende Abschnitt der Baculovirus-DNA in einen Vektor inseriert und in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

Mit dem Klonierungs-Kit können PCR-Produkte direkt in den Vektor kloniert werden. Der Topo Ta-Vektor (pCR-XL-TOPO) besitzt zwei 5'-CCCTT-3'-Regionen, die durch die DNA Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus gespalten werden, so dass ein Thymidin-Überhang entsteht. Die Topoisomerase I bleibt zunächst kovalent gebunden und verhindert somit die Selbstligation (Shuman, 1991). Während der Amplifikation der einzufügenden DNA werden von der Taq-Polymerase durch terminale Transferaseaktivität einzelne matrizenunabhängige überhängende Adenin-Basen an das 3'-Ende des Amplifikats angehängt. Die Topoisomerase fügt dann das Amplifikat mit dem überstehenden Adenin an den Thymidin-Überhang ein.

Zur Auswahl der Plasmide, die das gewünschte Amplifikat inseriert hatten, wurde die weiß/blau-Selektion verwendet. Die Klonierungsstelle im Plasmid befindet sich in dem LacZ-Gen, das durch die Insertion eines Amplifikats unterbrochen wird. Das LacZ-Gen kodiert für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase, die aber nur mit dem C-terminalen  $\omega$ -Fragment aktiv ist. Wird das LacZ-Gen durch Insertion unterbrochen, sind beide Fragmente zu weit entfernt und die Kolonien bleiben weiß, ohne Insertion verfärben sie sich blau (Chakrabarti et al., 1985). Nötig dafür ist die Inkubation mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) in der Luria-Bertani-Platte (LB-Platte). IPTG induziert das *lac-operon* von *E. coli*, ohne von der  $\beta$ -Galactosidase umgesetzt zu werden. X-Gal wird bei fehlender Insertion von der aktiven  $\beta$ -Galactosidase in Galactose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl gespalten. 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl reagiert mit Sauerstoff zu dem blauen Farbstoff 5'5-Dibrom-4'4-Dichlor-Indigo und färbt so die Bakterienkolonien.

2  $\mu$ l TOPO Cloning Reaktionslösung wurden in ein Gefäß mit kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben, vermischt und für 5-30 Minuten zur Inkubation auf Eis (Eismaschine Scolsman) gestellt. Anschließend erfolgte für 30 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C und ein sofortiges Kühlstellen auf Eis. 250  $\mu$ l S.O.C.-Medium (One shot Reagents, Invitrogen) wurden hinzugefügt und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. 10-50  $\mu$ l der Lösung wurden anschließend auf eine Petrischale gegeben, die mit Ampicillin versetzten LB-Agar (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 1000 ml VE-Wasser, pH 7,5, 1,5% (w/v) Agar-Agar) und Ampicillin (Ampicillin 2,0; Ratiopharm) enthielt und so selektiv wirkte. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C (Certomat, Braun Biotech Instruments). Es wurden nur von

den weißen oder hellblauen Kolonien kleine Mengen entnommen, die dunkelblauen hatten das Insert nicht aufgenommen (Gebrauchsanleitung Topo Ta Cloning Kit).

Die Kolonien wurden in LB Medium mit Ampicillin in 5 ml Schraubgefäßen im Schüttelinkubator bei 220 rpm und 37°C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Plasmide mit einem kommerziell erhältlichen Kit (QIAprep-Kit Spin Miniprep, Qiagen) isoliert. Die Übernachtskulturen wurden mit 6.000 rpm zentrifugiert, so dass sich am Boden ein Pellet bildete, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit dem Puffer P1, der RNase A enthält, gelöst. Der zweite Puffer P2 wurde hinzugeben und vorsichtig geschüttelt. Mit Zugabe des dritten Puffers N3 kam es zu einem weißen, milchigen Niederschlag, der die zerstörten Bakterienstrukturen enthielt. Dieser Niederschlag wurde für 10 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert, und nur der Überstand wurde in die Silikat-Säule überführt und erneut bei 13.000 rpm für 30-60 Sekunden zentrifugiert. Die Plasmide wurden von der Silikat-Membran festgehalten, während alle anderen Stoffe in das Auffangröhrchen ausgewaschen wurden. Als letzter Schritt wurden die gebundenen Plasmide mit 0,75ml PE-Puffer gelöst und erneut bei 13.000 rpm für 30-60 Sekunden zentrifugiert (Gebrauchsanleitung QIAprep Kit).

Um das Ergebnis der Plasmid-Erzeugung zu kontrollieren, wurde eine PCR mit dem Mastermix für das 505 bp-Amplifikat durchgeführt (s. Anhang 7.2.1 Mastermix und PCR-Protokoll „Baculovirus mit Sonden“). Die Klone wurden anschließend gemischt.

Zur exakten Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA wurden 2 µl der Plasmidlösung mit einem Licht-Absorptionsverfahren (NanoDrop, peQLab Biotechnology GmbH) gegen die verwendete Elutionslösung vermessen. Es wurde bei 260 nm und 280 nm die Absorption (= OD) des emittierten Lichtes gemessen. Über die Formel  $c = OD_{260} \times V \times F$  wurde die Konzentration der Plasmid-DNA berechnet. Hierbei wurde die Konzentration  $c$  in ng/µl angegeben,  $OD_{260}$  gab die Absorption bei 260 nm an,  $V$  stand für den Verdünnungsfaktor und  $F$  ist ein Multiplikationsfaktor, der für doppelsträngige DNA 50 beträgt. Über den Quotienten von  $OD_{260}/OD_{280}$  konnte eine Verunreinigung durch Proteine gemessen werden, reine DNA-Lösungen weisen einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 auf.

Die Plasmidlösung wurde dann so verdünnt, dass  $2 \times 10^{11}$  Kopien/ml bzw.  $10^9$  Kopien/Ansatz enthalten sind. Diese Lösung wurde dann in einer Verdünnungsreihe in eine Echtzeit-PCR eingesetzt und als bekannte Konzentrationen definiert, hierfür wurde

wieder der Mastermix und das Protokoll von „Baculovirus mit Sonden“ verwendet (s. Anhang 7.2.1).

### 2.9 Vergleich zwischen Baculovirus im Lysispuffer und als Probe

Um die Baculovirus-Konzentration im Lysispuffer des automatischen DNA-Isolationsverfahrens in gewünschter Konzentration einstellen zu können, muss bekannt sein, ob es einen Verlust von Baculovirus-DNA gibt, wenn der Zellkulturüberstand in den Lysispuffer gegeben wird, anstatt den Zellkulturüberstand normal als Probe aufzuarbeiten.

Für den Versuch wurde der Zellkulturüberstand des Baculovirus in drei logarithmischen Potenzen (1:10 - 1:10<sup>3</sup>) mit Insektenzellkulturmedium verdünnt. Die letzte Verdünnung wurde auf zwei Aliquots aufgeteilt. Das erste Aliquot wurde um eine weitere Zehnerpotenz weiterhin mit Zellkulturmedium verdünnt. Für das zweite Aliquot wurde Lysispuffer des automatisierten DNA-Isolationsverfahrens verwendet.

Für den ersten Lauf des automatisierten DNA-Isolationsverfahrens (vgl. 2.2) wurden aus dem ersten Aliquot, das ausschließlich mit Zellkulturmedium verdünnt wurde, viermal 200 µl entnommen und als Probe aufgearbeitet. Zusätzlich wurden noch je 200 µl aus jedem Verdünnungsschritt hinzugefügt, um die Verdünnungsreihe zu überprüfen. Die Reagenzien des automatisierten Verfahrens wurden nicht verändert.

Im zweiten Lauf des automatischen Isolationsverfahrens wurden viermal 200 µl Insektenzellkulturmedium eingesetzt, das selbst keine Virus-DNA enthält. Dafür wurde der Lysispuffer mit dem Baculovirus-haltigen Lysispuffer ersetzt.

Es entstanden aus jeder Probe 100 µl Lösung mit isolierter DNA, die bis zur PCR bei -18°C eingefroren wurden.

Für die PCR wurde der Mastermix „Baculovirus mit Sonden“ (s. Anhang. 7.2.1) verwendet mit den Primern für das 505 bp große Amplifikat und auch das dazugehörige Protokoll für die Echtzeit-PCR. Als Negativkontrolle wurden 5 µl *Aqua ad iniectabilia* benutzt und als Positivkontrolle 5 µl unverdünnter Baculovirus-Zellkulturüberstand. Zur Quantifizierung wurden 5 µl Plasmid mit einer Konzentration von 10<sup>9</sup> Kopien/Ansatz mitgeführt.

### 2.10 Inteferenz zwischen Baculovirus und HSV bzw. CMV

Um die optimale Konzentration an Baculovirus-DNA zu finden, die sicher und konstant von dem DNA-Extraktionsgerät (vgl. 2.2) auf die Proben verteilt, mit aufgereinigt und

zuverlässig in der Echtzeit-PCR amplifiziert wird, wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Gleichzeitig musste die Konzentration niedrig genug sein, um den Nachweis selbst niedriger Konzentrationen humanpathogener Viren nicht zu beeinträchtigen.

Hierfür wurde je eine Verdünnungsreihe aus CMV- bzw. HSV-Zellkulturüberständen hergestellt, die beide von  $10^6$  Kopien/ml in Zehnerpotenzen mit Zellkulturmedium verdünnt wurden, so dass die Verdünnungsschritte  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  und  $10^2$  Kopien/ml (500, 50, 5 und 0,5 Kopien/Ansatz) entstanden. Hiervon wurden je Probe 200 µl eingesetzt.

Vom Baculovirus wurde ebenfalls Zellkulturüberstand verdünnt und zwar auf ca.  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 und 1 Kopien/Ansatz (ca.  $2 \times 10^7$  -  $2 \times 10^2$  Kopien/ml) im Lysispuffer, der später in das automatisierte Extraktionsverfahren (vgl. 2.2) eingesetzt wurde. Die ersten Verdünnungsschritte fanden mit Insektenzellkulturmedium statt, nur für den jeweils letzten Verdünnungsschritt wurde der Lysispuffer verwendet.

Insgesamt wurde die DNA der HSV- und CMV-Verdünnungsreihen siebenmal mit dem automatischen Verfahren isoliert, zweimal mit unverändertem Lysispuffer und dann mit dem Baculovirus-haltigen Lysispuffer verschiedener Konzentration. Außer dem Lysispuffer wurde das Protokoll der automatisierten DNA-Isolation unverändert belassen. Die erhaltenen Proben wurden bei  $-18^\circ\text{C}$  eingefroren.

Der Echtzeit-PCR-Lauf bestand aus den HSV- und CMV-Proben, die jeweils mit der gleichen Konzentration Baculovirus isoliert worden waren. Als Referenzwerte wurden die Verdünnungsreihen ( $10^2$ - $10^5$  Kopien/ml) des *Herpes simplex*-Virus und des Cytomegalievirus, die mit dem unveränderten Lysispuffer isoliert worden waren, im einfachen Ansatz eingesetzt. Für die Proben, die mit dem Baculovirus-versetzten Lysispuffer aufgearbeitet worden waren, wurde ein doppelter Ansatz gewählt. Als positive Kontrollen wurden 5 µl Zellkulturüberstände der jeweiligen Viren, bei HSV und CMV je in einer hohen Konzentration ( $10^6$  Kopien/ml) und in einer niedrigen Konzentration ( $10^4$  Kopien/ml) eingesetzt. Das Baculovirus wurde als unverdünnter Zellkulturüberstand für die Positivkontrolle verwendet und für die Negativkontrolle *Aqua ad iniectabilia*. Zur Quantifizierung des Baculovirus wurden 5 µl Baculovirusplasmid in einer Konzentration von  $10^9$  Kopien/Ansatz als Standard mitgeführt. Es wurden die Mastermixe und PCR-Protokolle „HSV mit Baculovirus“ (s. Anhang 7.2.5) und „CMV mit Baculovirus“ (s. Anhang 7.2.7) angesetzt, wobei die Echtzeit-PCR-Protokolle für HSV und CMV identisch waren.

### 2.11 Patientenproben

Nach allen Vorversuchen wurde das Baculovirus als interne Kontrolle an Patientenproben getestet, die für CMV, HBV oder HSV in der Diagnostik positiv getestet worden waren. Die bereits pseudonymisierten Probennummern wurden durch Versuchsummern ersetzt. Bei der Auswahl der Patientenproben wurde bei HSV und CMV darauf geachtet, dass möglichst ein breites Spektrum von Probenarten, wie Blutserum oder -plasma, Liquor, Abstriche, Bronchial-Lavage oder Urin, ausgewählt wurden. Bei HBV standen nur Blutserum und -plasmen zur Verfügung. Außerdem sollte die Bandbreite der möglichen Viruskonzentrationen abgedeckt sein, so dass die HBV-Konzentration mit der größten Spannbreite von  $7 \times 10^3$  Kopien/ml bis  $10^8$  Kopien/ml reichte. Aus technischen Gründen mussten noch mindestens 400 µl der Probe zur Verfügung stehen, damit aus zweimal 200 µl Probe DNA isoliert werden konnte.

20 µl Baculovirus-Zellkulturüberstand wurden in drei Verdünnungsschritten mit Insektenzellkulturmedium um je eine Zehnerpotenz und im letzten vierten Schritt mit Lysispuffer des automatisierten Nukleinsäuren-Isolationsverfahren wiederum um eine Zehnerpotenz verdünnt, so dass nach der DNA-Isolation eine Konzentration von 10-20 Kopien/Ansatz in jeder einzelnen Patientenprobe zu finden war. Der mit Baculovirus versetzte Lysispuffer wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb von einer Woche verbraucht.

Die bei -20°C eingefrorenen Patientenproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurden sie zweimal mit dem automatisierten DNA-Extraktionsverfahren (vgl. 2.2) aufgearbeitet, beim ersten Lauf unter Standardbedingungen laut Gebrauchsanweisung. Im zweiten Lauf wurde statt des normalen Lysispuffers der mit Baculovirus versetzte Lysispuffer verwendet. Die restlichen Bedingungen wurden nicht verändert. In jedem Durchgang des Extraktionsverfahrens wurde nur eine Art der humanpathogenen Viren eingesetzt. Als Positivkontrollen wurden HSV, CMV und HBV in einer Konzentration von jeweils  $10^4$  und  $10^6$  Kopien/ml verwendet, die aus Zellkulturen (HSV und CMV) bzw. aus Patientenproben (HBV) gewonnen wurden. Für das Baculovirus wurde ein unverdünnter Zellkulturüberstand benutzt. Um die Konzentration des Baculovirus im Lysispuffer zu messen, wurden pro DNA-Isolation 200 µl Insektenzellkulturmedium mitgeführt, die dann nur DNA des dem Lysispuffer zugefügten Baculovirus enthielt. Nach der DNA-Isolierung wurden die Proben bei -18°C tiefgefroren.

Mit einer Echtzeit-PCR wurden die bei Raumtemperatur aufgetauten Proben amplifiziert und quantifiziert. Für die PCR wurde das entsprechende Protokoll gewählt, für CMV und HSV das „CMV und HSV-Protokoll“ und für HBV das „HBV-Protokoll“ (s. Anhänge 7.2.4, 7.2.6 und 7.2.2). Außerdem wurde für jedes Virus der entsprechende Mastermix angesetzt, und zwar einmal ohne und einmal mit den Primern und Sonden für das Baculovirus (Mastermixe: „CMV“, „CMV mit Baculovirus“, „HSV“, „HSV mit Baculovirus“, „HBV“, „HBV mit Baculovirus“; s. Anhänge 7.2.2 bis 7.2.7). Die Patientenproben wurden immer paarweise in die Echtzeit-PCR eingesetzt, so dass die zusammengehörenden Proben, die am selben Tag isoliert worden waren, auch im gleichen Echtzeit-PCR-Lauf amplifiziert wurden. Als Positivkontrollen wurden die entsprechenden humanpathogenen Viren in den Konzentrationen  $10^4$  und  $10^6$  Kopien/ml verwendet. Da immer zwei Mastermixe gebraucht wurden, einmal mit den Primern und Sonden für das Baculovirus und einmal ohne, wurden auch zwei negative Kontrolle (*Aqua ad iniectabilia*) verwendet. Zur Quantifizierung des Baculovirus wurden 5 µl Baculovirus-Plasmid in einer Konzentration von  $10^9$  Kopien/Ansatz ( $2 \times 10^{11}$  Kopien/ml) eingesetzt.

### 2.12 Auswertung der Ergebnisse

Die statistische und graphische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Windows Office 2003 und SPSS 11.5 für Windows. Die Fotos wurden mit einer Probeversion von Adobe Photo Shop und Picasa bearbeitet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 11.5. Es wurde zunächst eine explorative Datenanalyse durchgeführt, wobei Mittelwert, 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes und Standardabweichung bestimmt wurden. Der Mittelwert ist das arithmetische Mittel der Einzelmessungen (Löffler et al., 2004). Das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes gibt eine Spannbreite an, zwischen deren Werten sich mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit der gesuchte, wahre Mittelwert der Grundgesamtheit befindet. Werte außerhalb des Konfidenzintervalls sind signifikant unterschiedlich (Löffler et al., 2004; Du Prel et al., 2009). Die Standardabweichung ist ein Streuungsmaß, das angibt, wie groß im Durchschnitt der einzelnen Messwert vom Mittelwert abweicht.

Zur Bestimmung der Signifikanz von unterschiedlichen Messergebnissen wurde der p-Wert berechnet; dies ist mit unterschiedlichen Testverfahren möglich. Zur Bestimmung des p-Wertes wird eine Nullhypothese formuliert, die aussagt, dass keine Differenz zwischen den Grundgesamtheiten besteht. Je kleiner der p-Wert ist, desto geringer die Wahrscheinlichkeit, dass der gemessene Unterschied durch den Zufall bedingt ist und

damit die Nullhypothese zutrifft. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 gewählt; dies entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Die Daten wurden vor dem t-Test mit dem Kolmogorov-Smirnov oder dem Shapiro-Wilk-Test bei kleinen Fallmengen auf Normalverteilung überprüft.

Um den Unterschied zwischen zwei abhängigen Proben zu beurteilen zu können, wurde der gepaarte t-Test mit Hilfe von SPSS durchgeführt. Der gepaarte t-Test lieferte neben den Daten zu Mittelwert und Standardabweichung auch den Standardfehler des Mittelwertes, das 95%-Konfidenzintervall und ein zweiseitiges Signifikanzniveau. Ein Signifikanzwert unter 0,05 wird als signifikant betrachtet (Löffler et al., 2004).

Zur Bewertung der Patientenprobe wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Sie gibt Auskunft über den linearen Zusammenhang zweier Messwerte. Die Korrelationsanalyse liefert den Korrelationskoeffizienten nach Pearson und das dazugehörige Signifikanzniveau. Der Korrelationskoeffizient liegt zwischen -1 und +1, wobei er bei -1 und +1 den perfekten negativen bzw. positiven linearen Zusammenhang anzeigt. Ein niedriger Betrag nahe 0 bedeutet, dass der funktionale Zusammenhang der beiden untersuchten Größen nicht oder nur äußerst schwer als linear zu akzeptieren ist.

Der Signifikanztest erlaubt eine Aussage darüber, ob die Korrelation auch in der Grundgesamtheit gegeben ist. Je niedriger der Signifikanzwert, umso niedriger ist die Irrtumswahrscheinlichkeit, ein p-Wert von kleiner 0,05 ist signifikant (Löffler et al., 2004; Schneider et al., 2010).



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswahl der Baculosequenz, -primer und –sonden

Da die humanpathogenen Viren große Variationen in ihrer Länge aufwiesen, wurden sie in drei Gruppen unterteilt, um für jede Gruppe ein entsprechend langes Amplifikat herzustellen und so eine möglichst ähnliche Amplifikationseffizienz während der Echtzeit-PCR zu gewährleisten. Um den Aufwand gering zu halten, wurde ein für alle Amplifikate des Baculovirus gleich bleibender Sense-Primer und drei unterschiedliche Antisense-Primer gesucht. Die Länge, Schmelztemperatur und GC-Gehalt der Primer sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Baculovirus-Primer	Position	Länge	Schmelztemperatur	GC-Gehalt
Sense-Primer	80918-80940	23 bp	62,4°C	52%
Antisense-Primer, kurzes Amplifikat	81128-81109	20 bp	56,7°C	55%
Antisense-Primer, mittleres Amplifikat	81310-81291	20 bp	55,3°C	45%
Antisense-Primer, langes Amplifikat	81422-81405	18 bp	56,0°C	56%

**Tabelle 1: Übersicht der Baculovirus-Primer**

Aus der Tabelle lassen sich die Länge, GC-Gehalte und Schmelztemperatur der ausgewählten Baculovirusprimer entnehmen. Das zu Grunde liegende Referenzgenom gi: 9627742, NC\_001623.

Das kleine Amplifikat, das für die Kontrolle der Viren *Herpes simplex*, Parvovirus B 19 und *Varizella zoster*-Virus gedacht ist (s. Anhang Tabelle 7), hat eine Länge von 211 bp, einen GC-Gehalt von 46% und eine Schmelztemperatur (*salt adjusted*) von 94°C.

Das Amplifikat mittlerer Länge soll die Amplifikation vom Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus und Humanen-Herpes-Virus 6 überprüfen (s. Anhang Tabelle 8). Es weist eine Länge von 393 bp, einen GC-Gehalt von 45% und eine Schmelztemperatur (*salt adjusted*) von 95°C auf.

Das große Amplifikat dient zur Amplifikationskontrolle vom Hepatitis B-Virus und hat eine Länge von 505 bp, einen GC-Gehalt von 45% und eine Schmelztemperatur (*salt adjusted*) von 96°C (s. Anhang Tabelle 9).

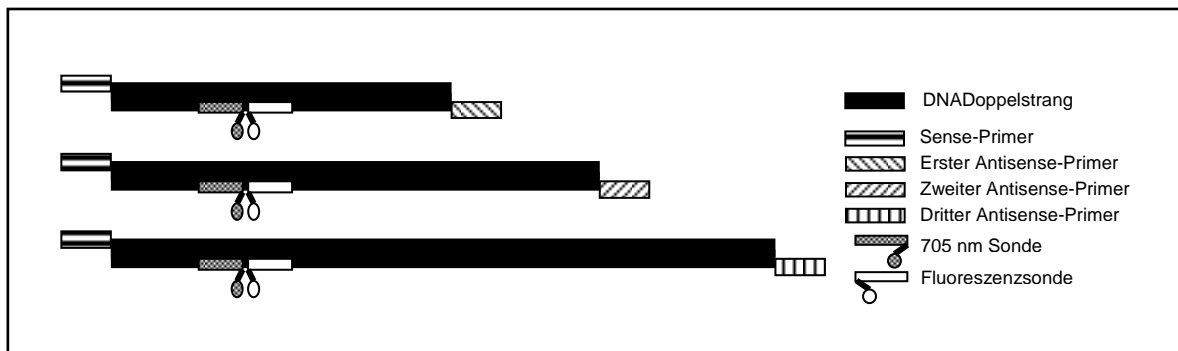
Die im Methodenabschnitt definierten Bedingungen für die FRET-Hybridisierungs-Sonden, wie GC-Gehalt, Schmelztemperatur, die fehlende Übereinstimmung mit dem humanem Genom sowie das Ausbleiben von Haarnadelstruktur, fanden sich auf dem Antisense-Strang wieder. Die Eigenschaften sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Baculovirus-Sonde	Position	Länge	GC-Gehalt	Schmelzpunkt
Donor-Sonde FL	81033-81006	28 bp	46,4 %	66,3° C
Acceptor-Sonde 705 nm	81004-80977	29 bp	37,9 %	64,0° C

**Tabelle 2      Übersicht der Baculovirussonden**

Die Tabelle gibt Position, Länge, GC-Gehalt und den Schmelzpunkt der verwendeten FRET-Hybridisierungssonden für das Baculovirus wieder. Das zu Grunde liegende Referenzgenom ist Referenzgenom gi: 9627742, NC\_001623. Die Sonden befinden sich auf dem Antisense-Strang.

Alle drei Amplifikate liegen auf dem Gen der AcMNPV-Helikase, die sich von den Basenpaaren 80694-84359 erstreckt. Sie gehört zur Baculovirus-Helikase Superfamilie. Das Enzym Helikase sorgt für die Entwindung der Helixstruktur während der DNA-Replikation. Sie ist essenziell für die DNA-Replikation, und Mutationen auf diesem Gen sind letal (Lu und Carstensen, 1991).



**Abbildung 2:    Darstellung der Baculovirus-Amplifikate**

Schematische Lage der Primer und Sonden auf den Baculovirus-Amplifikaten

### 3.2 Verdünnung und Quantifizierung des Baculovirus

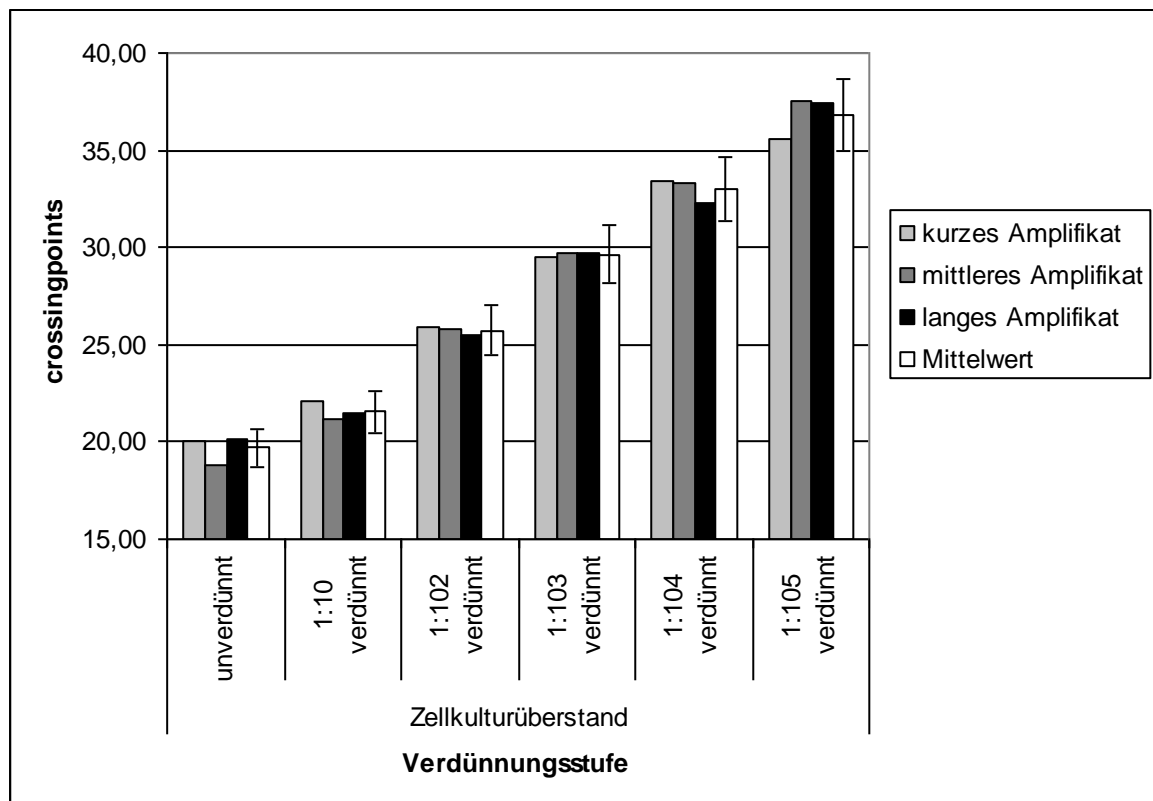
Die Verdünnungsreihe zeigt, dass es zwischen den drei verschiedenen Amplifikatlängen keinen Unterschied in der Amplifizierungseffizienz gibt (Abbildung 3). Die Nachweisgrenze für das Baculovirus liegt bei ca.  $10^3$  Kopien/ml, unterhalb dieser Konzentration war das Baculovirus nur noch stochastisch nachweisbar.

Außerdem gibt die Tabelle 3 einen Überblick darüber, bei welchem crossing point in etwa welche Konzentration an Baculovirus zu erwarten ist.

	kurzes Amplifikat		mittleres Amplifikat		langes Amplifikat	
Verdünnung	cp	Konzentration	cp	Konzentration	cp	Konzentration
unverdünnt	20,1	$1,64 \cdot 10^8$	18,8	$3,97 \cdot 10^8$	20,2	$1,51 \cdot 10^8$
1:10 verdünnt	22,1	$4,20 \cdot 10^7$	21,2	$7,81 \cdot 10^7$	21,5	$6,13 \cdot 10^7$
1:10 <sup>2</sup> verdünnt	25,9	$3,00 \cdot 10^6$	25,8	$3,22 \cdot 10^6$	25,5	$4,06 \cdot 10^6$
1:10 <sup>3</sup> verdünnt	29,5	$2,58 \cdot 10^5$	29,7	$2,30 \cdot 10^5$	29,7	$2,24 \cdot 10^5$
1:10 <sup>4</sup> verdünnt	33,4	$1,82 \cdot 10^4$	33,3	$1,89 \cdot 10^4$	32,3	$3,85 \cdot 10^4$
1:10 <sup>5</sup> verdünnt	35,5	$4,13 \cdot 10^3$	37,5	$1,05 \cdot 10^3$	37,4	$1,12 \cdot 10^3$

**Tabelle 3: Verdünnungsreihe des Baculovirus mit crossing points und Konzentration**

Die Tabelle zeigt die Konzentrationen in Kopien/ml mit dazugehörigen crossing points (cp) einer Verdünnungsreihe des Baculovirus mit den drei verschiedenen Amplifikatlängen. Es ist kein Unterschied in der Amplifikationseffizienz bei unterschiedlicher Länge festzustellen.



**Abbildung 3: Vergleich der PCR-Effizienz bei verschiedenen Amplifikatlängen**

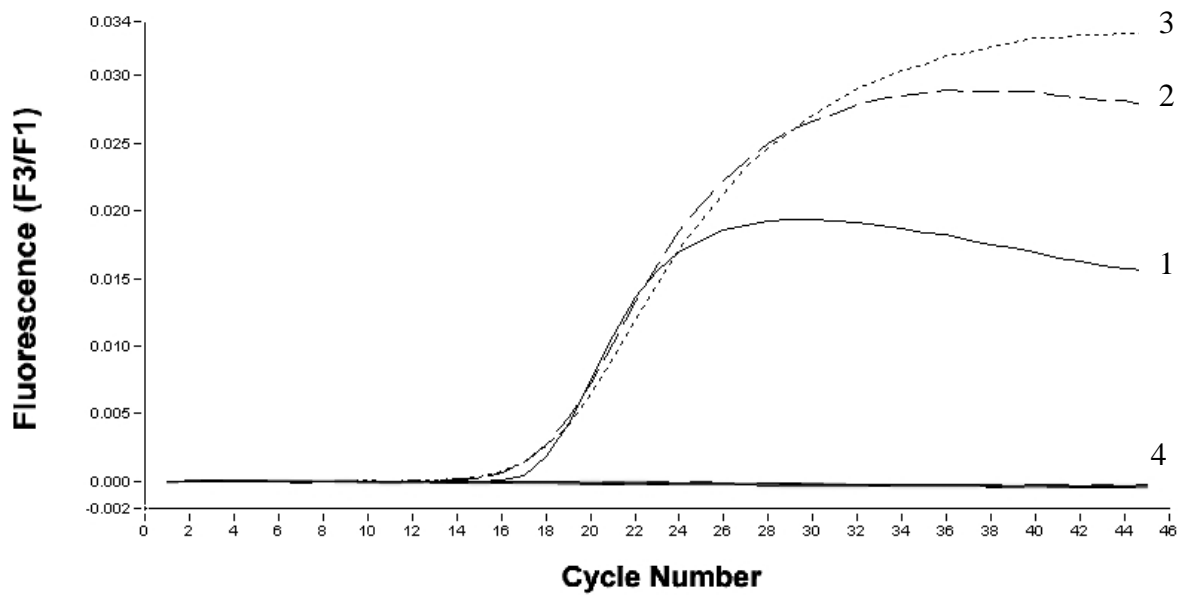
Die Mittelwerte sind aus den drei Amplifikatlängen gebildet und mit einem 5%-Fehlerindikator angegeben. Die Fluoreszenz wurde im Kanal F3 gemessen.

### 3.3 Bindungsselektivität der Primer und Sonden

#### 3.3.1 Bindungsselektivität der Primer und Sonden gegenüber humanem Genom

Ganz wesentlich ist, dass die für das Baculovirus verwendeten Primer und Sonden nur an das Baculovirus und nicht an die humanpathogenen Viren oder das humane Genom binden können. Durch DNA-Sequenzvergleich ließ sich eine Bindungsfähigkeit der Baculovirus-Primer und -Sonden an die humanpathogenen Viren ausschließen, für das menschliche Genom bestanden Zweifel. Um eine solche Bindungsfähigkeit auszuschließen, wurden in diesem Versuch alle drei Mastermixe des Baculovirus an Patientenproben verschiedenen Ursprungs getestet. Dazu gehörten periphere Blutlymphozyten, broncho-alveoläre Lavage, Pleurapunktate, Urinproben und Serum- bzw. Plasmaproben. Dies ist nur eine exemplarische Darstellung. Nach Abschluss des Experiments wurde die PCR an ca. 200 Patientenproben getestet, ohne dass Interaktionen mit dem humanen Genom festgestellt wurden (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

In der Fluoreszenzmessung während der Echtzeit-PCR steigen nur die Kurven der Baculovirus-Zellkulturüberstände an (s. Abbildung 4). Alle Messungen der eingesetzten Patientenproben und die negativen Kontrollen verbleiben innerhalb der Grundfluoreszenz. Die crossing points für die Positivkontrollen liegen bei 13,6 cp; 13,8 cp und 16,4 cp. Bei Kurve 1 (kurzes Amplifikat) tritt der Hook-Effekt ein (siehe auch 4.2).

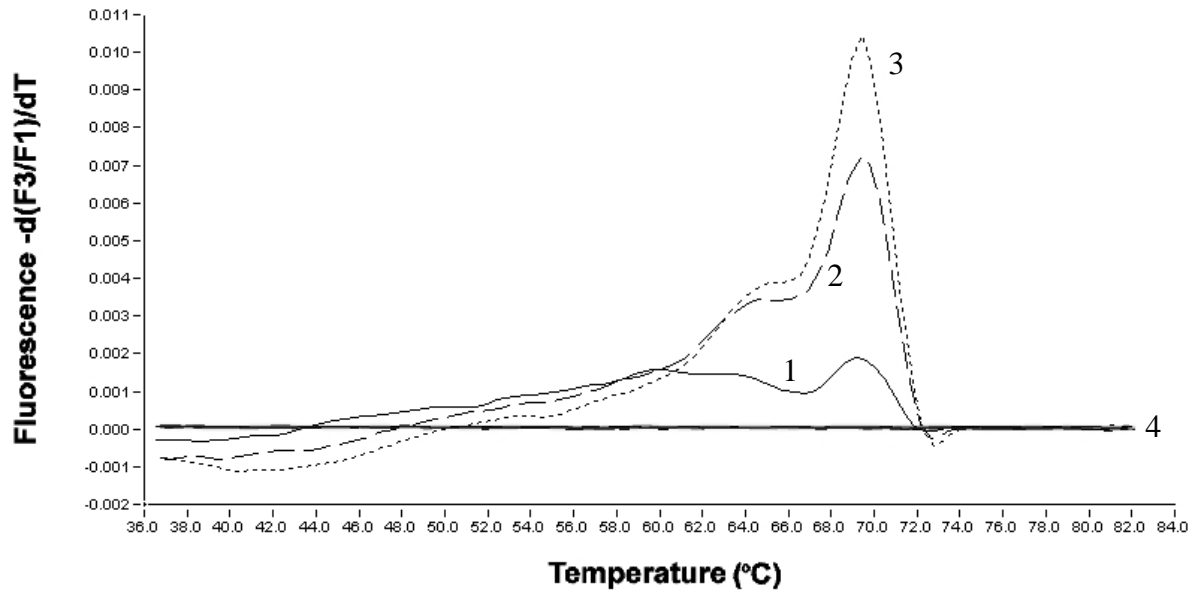


**Abbildung 4: PCR-Amplifikationskurve zur Bindungsgenauigkeit von Primer und Sonden**

Amplifikationskurven einer Echtzeit-PCR, in der getestet wurde, ob die Baculovirus-Primer und –Sonden am menschlichen Genom binden. Acht verschiedene virenfreie Patientenproben wurden dazu mit den drei verschiedenen Baculovirus-Mastermixen amplifiziert. Gemessen wurde in F3/F1, da die Baculovirus-Sonde bei 705 nm in dem Kanal F3 gemessen wird (x-Achse Zyklusnummer, y-Achse relative Fluoreszenzeinheiten). Ein Kurvenanstieg und damit eine Amplifikation ist nur bei den Positivkontrollen des Baculovirus zu sehen.

- 1: Baculovirus-Zellkulturüberstand mit dem Primerpaar für das kurze Amplifikat, Probennummer 2
- 2: Baculovirus-Zellkulturüberstand mit dem Primerpaar für das mittlere Amplifikat, Probennummer 12
- 3: Baculovirus-Zellkulturüberstand mit dem Primerpaar für das lange Amplifikat, Probennummer 22
- 4: Acht verschiedene virus-freie Patientenproben (Serum/Plasma, Urin, bronchoalveoläre Lavage, Pleurapunktat und periphere Blutlymphozyten), die mit den 3 verschiedenen Primern amplifiziert wurden, sowie drei Negativkontrollen

Die Schmelzkurve zeigt, dass nur die Resultate der Zellkulturüberstände des Baculovirus positiv sind und keine der eingesetzten Patientenproben (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5: PCR-Schmelzkurve zur Bindungsgenauigkeit von Primer und Sonden**

Schmelzkurve einer Echtzeit-PCR gemessen in  $-d(F3/F1)/dT$ : Auf der x-Achse ist die Temperatur aufgetragen, während die y-Achse die erste negative Ableitung der Fluoreszenz über die Temperaturänderung zeigt. Verschiedene für humanpathogene Viren negativ getestete Patientenproben wurden mit den drei Mastermixen des Baculovirus amplifiziert. Nur bei den Baculoviruskontrollen zeigen sich spezifische Kurven, die auf ein Amplifikat deuten. Die Patientenproben und die Negativkontrollen haben keinen Fluoreszenzanstieg.

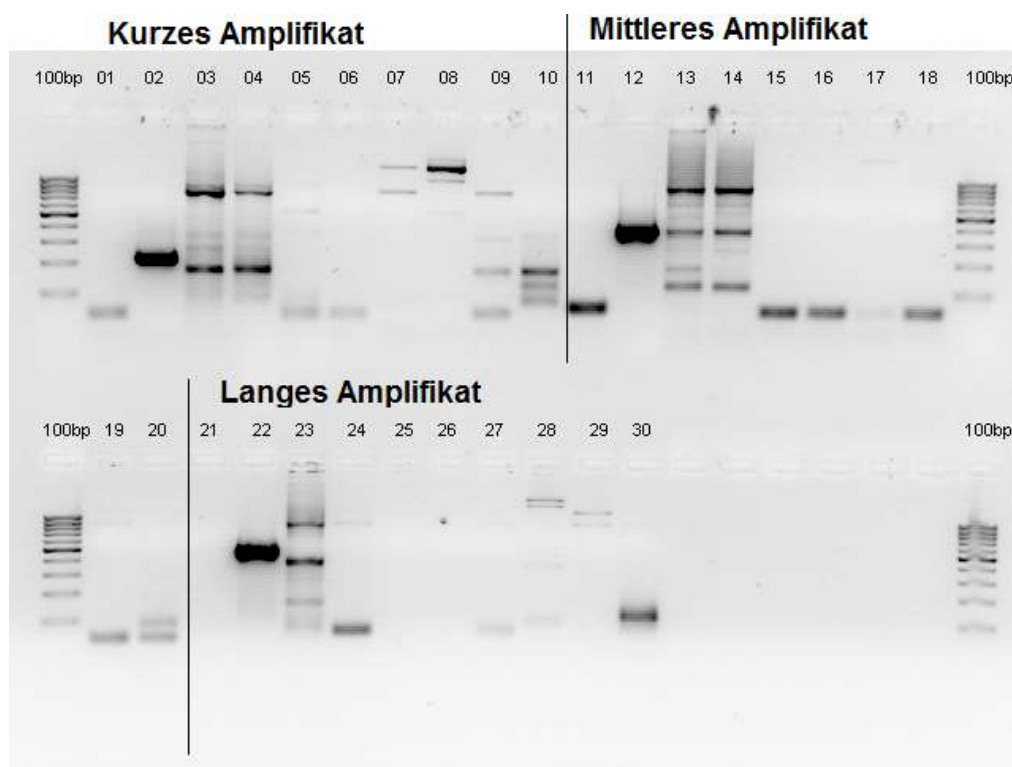
- 1: Baculovirus-Zellkulturüberstand mit dem Primerpaar für das kurze Amplifikat, Probennummer 2
- 2: Baculovirus-Zellkulturüberstand mit dem Primerpaar für das mittlere Amplifikat, Probennummer 12
- 3: Baculovirus-Zellkulturüberstand mit dem Primerpaar für das lange Amplifikat, Probennummer 22
- 4: Acht verschiedene Patientenproben verschiedenen Ursprungs, amplifiziert jeweils mit den Primern für das Baculovirus für das lange, mittlere und kurze Amplifikat und drei Negativkontrollen.

Das Agarosegel der PCR-Produkte (s. Abbildung 6) zeigt für die Baculovirus-Zellkulturüberstände dicke Banden bei den verschiedenen Längen. Das kleinste Amplifikat hat eine Länge von 211 bp (Spur 2), das mittlere Amplifikat von 393 bp (Spur 12) und das große Amplifikat von 505 bp (Spur 22). Bei den negativen Kontrollen (Spur 1, 11 und 21) sind kleine unspezifische Produkte wie z. B. Primer-Dimere (kleiner 100 bp) zu erkennen. Auch in verschiedenen anderen Spuren (5, 6, 9, 15, 16, 18, 19 und 20) finden sich Banden in derselben Größe wie die Primer-Dimere der negativen Kontrollen.

Bei allen anderen, insbesondere bei den peripheren Blutlymphozyten und den bronchoalveolären Lavagen, kommen unspezifische Banden verschiedener Größe und Stärke vor. Bei den Primerpaaren für das kurze und lange Amplifikat sind allerdings keine Banden mit denselben Längen, wie die Baculovirus-Amplifikate zu finden. Es entstanden

also Amplifikate; diese sind aber unspezifisch und unterscheiden sich in der Länge von den Baculovirusamplifikaten.

Anders sieht es bei dem Mastermix für das mittlere Amplifikat aus. Auch hier entstanden in der einen Urinprobe und in den Serumproben Amplifikate unspezifischer Länge (Spuren 17,19, 20). Bei den Lymphozyten (Spur 13) und der bronchoaveolären Lavage (Spur 14) sind neben unspezifischen Banden anderer Länge auch Banden derselben Länge, wie das mittlere Baculovirusamplifikat von ca. 400 bp zu sehen. Diese reagieren aber nicht mit den spezifischen Sonden, wie die Abbildung 4 und Abbildung 5 zeigen.



**Abbildung 6: Agarosegel zur Bindungsgenauigkeit der Primer und Sonden**

Agarosegel von den PCR-Amplifikaten bei denen menschliches Genom aus verschiedenen virus-freien Patientenproben mit den drei verschiedenen Baculovirus-Primern und –Sonden amplifiziert wurden. Es entstehen neben den gesuchten Amplifikaten mit den Längen 211 bp (kleines Amplifikat), 393 bp (mittleres Amplifikat) und 505 bp (großes Amplifikat) auch unspezifische Banden, wie Primer-Dimere. In den Spuren 13 (Lymphozyten) und 14 (BAL) entstehen Banden von ca. 393 bp, die der Ampifikatlänge des Baculovirus entsprechen.

Spuren 1, 11 und 21 negative Kontrollen

Spuren 2, 12 und 22 Zellkulturüberstand des Baculovirus

Spuren 3, 13 und 23 Lymphozyten

Spuren 4, 14 und 24 bronchioalveoläre Lavage (BAL)

Spuren 5, 6, 15, 16, 25 und 26 Pleurapunktate

Spuren 7, 8, 17, 18, 27 und 28 Urinproben

Spuren 9, 10, 19, 20, 29 und 30 Serum- bzw. Plasmaproben

### 3.3.2 Bindungsselektivität der Primer und Sonden bei Zellkulturen und deren Überstände

Da die interne Kontrolle auch für die PCR von Viren aus Zellkulturen verwendet werden soll, dürfen die Primer und Sonden des Baculovirus in der PCR nicht mit den Zellen der Zellkulturen interagieren. Es wurden für den Versuch sowohl Zellkulturüberstände als auch Zellen mit den verschiedenen Mastermixen amplifiziert. In der Fluoreszenzkontrolle der PCR stieg ausschließlich das Fluoreszenz-Signal der mit Baculovirus-infizierten Zellkulturen, die als Positivkontrolle verwendet wurden. Bei den nicht infizierten Zellkulturen und deren Überstände kam es zu keinem Fluoreszenzanstieg, also blieb eine Amplifikation aus. Die Positivkontrolle von HSV lag bei 26,3 crossing points und die positive Kontrolle von CMV bei 29,6 cp in der Messung F2/F1 (LC Red 640). In F3/F1 (LC Red 705, interne Kontrolle) waren die drei Positivkontrollen der Baculovirus-Amplifikate unterschiedlicher Länge zwischen 22,0 und 28,0 crossing points zu sehen. Bei allen anderen Proben der Zellkulturen wurde kein Signalanstieg, weder in F2/F1 noch in F3/F1, gemessen.

Auch in den Schmelzkurven  $-d(F2/F1)/dt$  und  $-d(F3/F1)/dt$  waren nur die Kurven der verschiedenen Positivkontrollen zu erkennen. Es wurden durch die Zugabe der Baculovirus-Primer und -Sonden keine spezifischen Amplifikate von den Zellkulturüberständen gebildet.

### 3.3.3 Veränderungen der PCR durch den Baculovirus-Mastermix und das Baculovirus

Der folgende Versuch sollte bestätigen, dass die Zugabe von Baculovirus keinen negativen Einfluss auf die PCR der humanpathogenen Viren hat. Er wurde mit HSV, CMV und HBV durchgeführt, die jeweils beispielhaft für die drei Längenklassifikationen stehen.

Um den Einfluss zwischen den hinzugefügten Primern und Sonden und dem eigentlichen Baculovirus differenzieren zu können, wurden drei verschiedene Ansätze gewählt und jeweils drei Proben gemessen, um Ungenauigkeiten zu minimieren. Die erste Gruppe ist die Kontrollgruppe; hier wurden die humanpathogenen Viren mit ihrem unveränderten Mastermix amplifiziert. In der nächsten Gruppe wurde das humanpathogene Virus mit einem Mastermix amplifiziert, der zusätzlich die Primer und Sonden des Baculovirus enthielt. Diese Gruppe ist zum einen wichtig, um Fehlamplifikationen durch Bindung von Baculovirus-Primern und -Sonden an dem humanpathogenen Virus auszuschließen, und zum anderen um Beeinträchtigungen durch die Zugabe zusätzlicher Primer und Sonden



### 3 Ergebnisse

auszuschließen. Es könnte auch zu Primer-Primer oder Primer-Sonden-Anlagerungen kommen, die die PCR verfälschen. In der dritten Gruppe wurde zusätzlich zu den Baculovirus-Primern und -Sonden auch das Baculovirus hinzugefügt.

Beispielhaft werden die Ergebnisse für das HBV präsentiert.

Es wurden für den Versuch drei Konzentrationen an HBV gezielt im Bereich der Nachweisgrenze für das HBV gewählt, da sich Einflüsse auf die PCR bei geringen Konzentrationen am deutlichsten zeigen; hohe Konzentrationen könnten dies überdecken. Die Konzentration von  $10^2$  Kopien/ml HBV erschien nur noch stochastisch und wird daher nicht gezeigt.

Bei der höchsten Konzentration von  $10^4$  Kopien/ml ist kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen feststellbar. Bei der mittleren HBV-Konzentration fällt auf, dass der Fluoreszenzanstieg für die Proben mit dem unveränderten Mastermix drei crossing points später erscheinen als die beiden veränderten Gruppen. Zwischen der Gruppe, die im Mastermix zusätzlich die Baculovirus-Primer und -Sonden enthält, und der Gruppe, der Baculovirus hinzugefügt wurde, zeigt sich kein Unterschied. Der Effekt, der hier zu sehen ist, verschiebt die Nachweisgrenze allerdings in die niedrigere Kopienanzahl (s. Tabelle 4).

	nur HBV	HBV, Sonden + Primer des Baculovirus	Differenz zwischen HBV und HBV, Sonden + Primer des Baculovirus	HBV mit Baculovirus	Differenz nur HBV und HBV mit Baculovirus
HBV $10^4$ K/ml	33,8 cp	32,7 cp	1,1 cp	32,6 cp	1,2 cp
	33,8 cp	33,0 cp	0,8 cp	32,1 cp	1,7 cp
	33,8 cp	32,8 cp	1,0 cp	32,4 cp	1,4 cp
HBV $10^3$ K/ml	36,5 cp	32,7 cp	3,8 cp	32,9 cp	3,6 cp
	36,8 cp	33,9 cp	2,8 cp	33,2 cp	3,6 cp
	36,5 cp	34,0 cp	2,5 cp	32,2 cp	4,3 cp

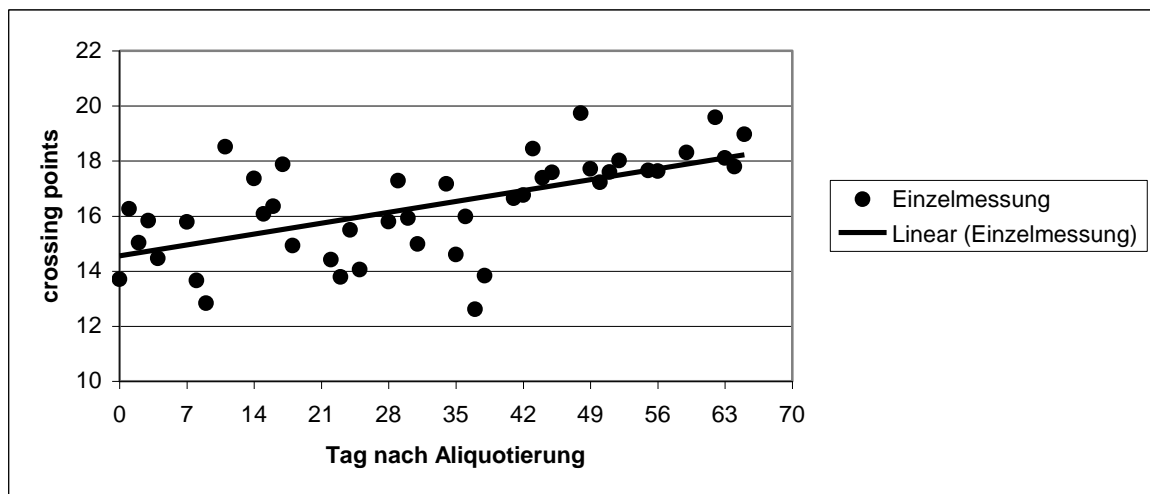
**Tabelle 4: Einfluss der zugegebenen Faktoren auf die HBV-Amplifikation**

Gezeigt werden hier die crossing points von HBV gemessen in F2/F1. Für den Versuch wurden verschiedene Konzentrationen HBV verwendet, von denen jeweils drei Ansätze in drei Gruppen vervielfältigt wurden. Einmal als unverändert Probe „nur HBV“, einmal mit dem Zusatz von Baculovirus-Primern und -Sonden als „HBV, Sonden + Primer des Baculovirus“ und in der letzten Gruppe mit den Primern und Sonden des Baculovirus im Mastermix und Baculovirus als „HBV mit Baculovirus“.

### 3.4 Stabilität des Baculovirus

#### 3.4.1 Langzeitstabilität des Baculovirus-Zellkulturüberstandes

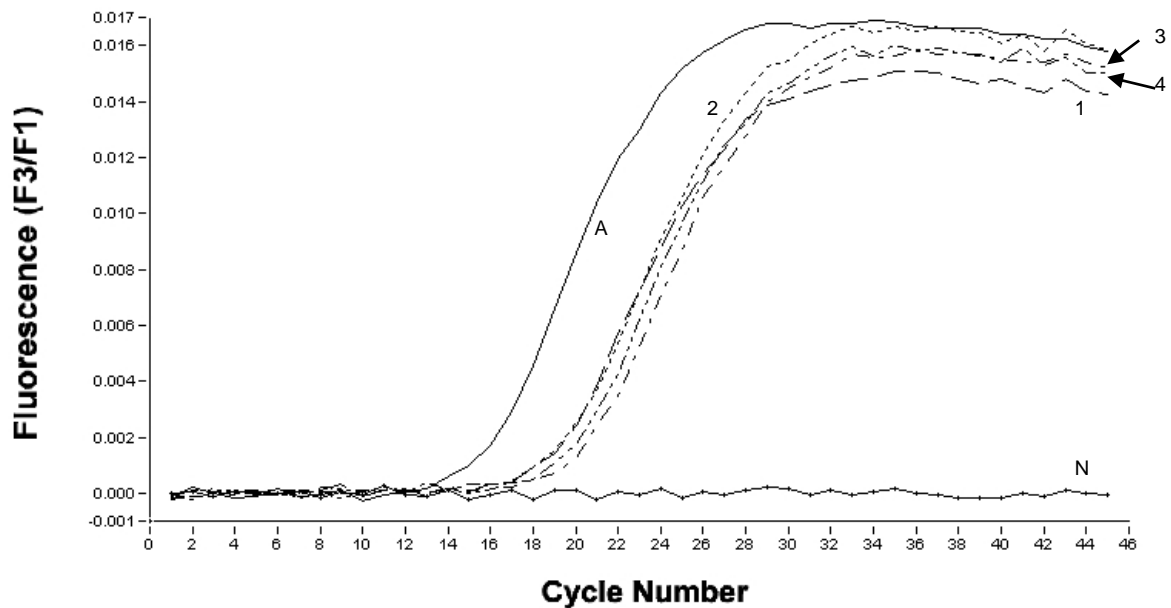
Der Versuch sollte zeigen, wie lange sich der Baculovirus-Zellkulturüberstand bei 4°C lagern lässt, ohne dass es zu einem Verlust der Baculovirus-DNA kommt. Man sieht starke Schwankungen, bei denen der niedrigste Wert bei 12,6 cp liegt und der höchste bei 19,6 cp mit einer Standardabweichung von 1,3 cp. Es ist eine Trendlinie mit positivem Anstieg zu erkennen. Innerhalb der zehn Wochen ist es zu einem Anstieg der crossing points gekommen und damit zu einem Abfall der DNA-Menge (s. Abbildung 7).



**Abbildung 7: Einfluss der Lagerung der internen Kontrolle auf deren Stabilität**

Tage nach Aliquotierung: Zeitdauer der Lagerung bei 4°C von Aliquots des Baculovirus-Zellkulturüberstandes. Es ist die Trendlinie der crossing points als Linie mit dargestellt. Auf der x-Achse ist die Zeit aufgetragen und auf der y-Achse die crossing points. Delta-cp pro Woche ca. 0,4 cp; Delta-cp in 10 Wochen ca. 4 cp.

Beispielhaft ist die Amplifikationskurve der siebten Woche dargestellt (s. Abbildung 8). Die crossing points liegen zwischen 15,9 cp am Montag (Tag 41) und 17,1 cp am Mittwoch (Tag 43) mit einem Wochenmittelwert von 16,5 cp und einer Standardabweichung von 0,5 crossing points.



**Abbildung 8: PCR-Amplifikationskurve der Woche 7 bei einer Lagerung über 10 Wochen**

In der Amplifikationskurve der Echtzeit-PCR (gemessen in F3/F1; x-Achse Zyklusnummer, y-Achse relative Fluoreszenzeinheit) ist die innerhalb einer Woche an verschiedenen Tagen isolierte Baculovirus-DNA abgebildet. Über zehn Wochen wurden die Aliquots gelagert, an jedem Werktag wurde die Baculovirus-DNA eines Aliquots isoliert. Dies ist das Wochenresultat der Woche 7: Isolate von Tag 41 (1), Tag 42 (2), Tag 43 (3) und Tag 44 (4). A ist der Ausgangswert von Tag 0 und N ist die Negativkontrolle.

#### 3.4.2 Kurzzeitstabilität bei verschiedenen Temperaturen

Da der Versuch zur Langzeit-Stabilität des Baculovirus gezeigt hat, dass sich die Virus-DNA nicht über mehrere Wochen lagern lässt, musste nun gezeigt werden, ob sich die DNA über eine Woche stabil ist. Gleichzeitig wurde eine Lagerung bei Kühlschranktemperatur von 4°C mit der Lagerung bei Raumtemperatur von ca. 21°C verglichen.

Der im Kühlschrank bei 4°C gelagerte Lysispuffer mit Baculovirus zeigt über die acht Tage keinen signifikanten Anstieg der crossing points in der Echtzeit-PCR und somit auch keinen signifikanten Abfall von Virus-DNA; der Abfall bleibt im Rahmen von zu erwartenden Schwankungen. Der gepaarte t-Test, mit dem die Ergebnisse der Tage 3 bis 7 (d3-d7) mit dem Tag des Ansetzens (d0) verglichen wurden, ergibt Signifikanzwerte p zwischen 0,06 und 0,38. Somit ist ein signifikanter Unterschied nicht feststellbar (s. Tabelle 5).

#### Test der gepaarten Stichproben bei 4°C gelagertem Lysispuffer im Vergleich zu den Ausgangswerten

	Anzahl der Proben	$\Delta_{cp} d0-dX$	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz		p – Wert (2-seitig)
				Unteres	Oberes	
d0 - d3	3	0,34	0,28	-0,54	1,21	0,31
d0 - d4	3	-0,24	0,24	-1,00	0,52	0,39
d0 - d5	3	0,89	0,35	-0,21	2,00	0,08
d0 - d6	3	0,59	0,27	-1,45	0,28	0,12
d0 - d7	3	-1,00	0,34	-2,08	0,08	0,06

**Tabelle 5: Signifikanztest zur Lagerung über 1 Woche bei Kühlschranktemperatur**

Lysispuffer wurde 60:1 mit Baculovirus-Zellkulturüberstand versetzt und bei 4°C über acht Tage aufbewahrt. Ab dem Tag 3 wurden drei Proben bestehend aus Virus-freiem Zellkulturmedium mit dem Baculovirus-versetzten Lysispuffer aufbereitet. Hier sind die Ergebnisse eines gepaarten t-Tests gezeigt, bei dem die Durchschnittswerte von den drei Proben gebildet und mit dem Durchschnitt des Ausgangstages 0 verglichen wurden. Es ist kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Der DNA-Gehalt des bei Raumtemperatur gelagerten Lysispuffers fällt nach dem vierten Tag ab; er unterscheidet sich von diesem Zeitpunkt an signifikant (p-Werte < 0,05) von den Ausgangswerten mit Signifikanzwerten von 0,01 bis 0,03 (s. Tabelle 6). Im Shapiro-Wilk-Test zeigte sich zuvor eine Normalverteilung für die beiden t-Tests.

#### Test der gepaarten Stichproben bei Raumtemperatur gelagerter Lysispuffer im Vergleich zu den Ausgangswerten

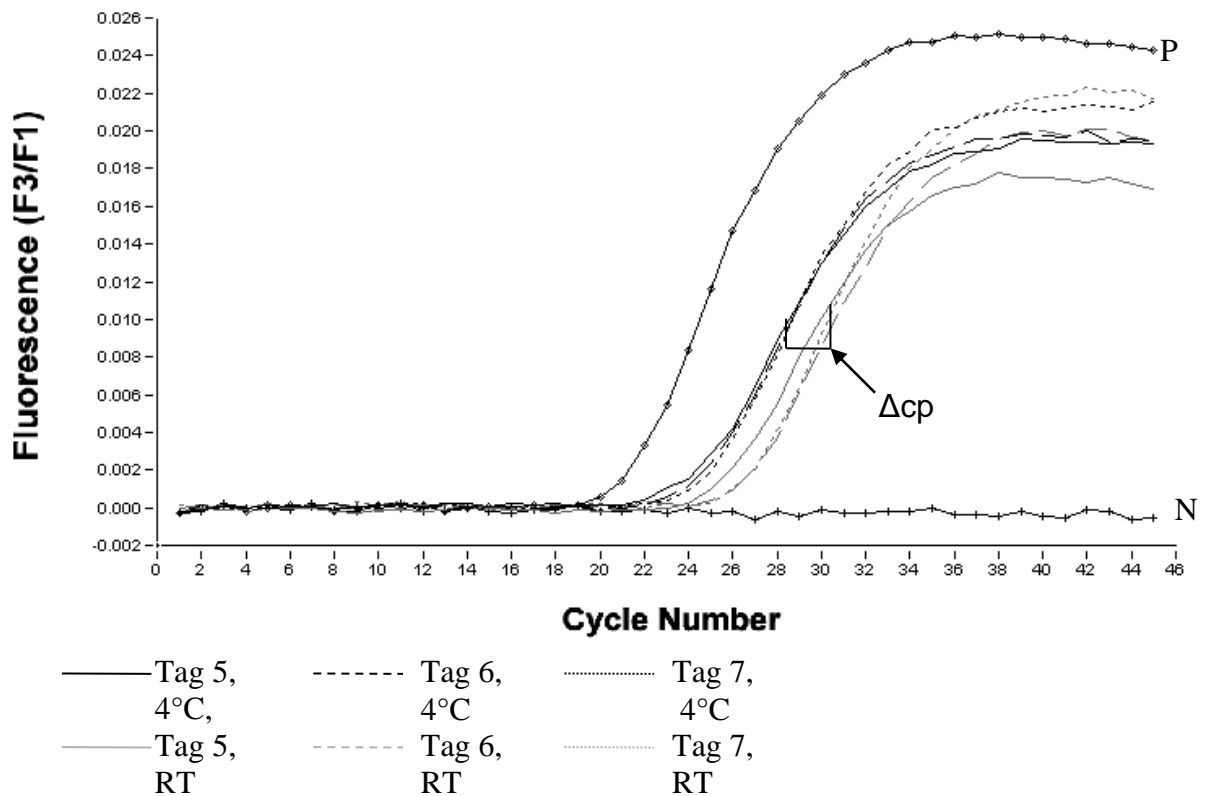
	Anzahl der Proben	$\Delta_{cp} d0-dX$	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz		p – Wert (2-seitig)
				Unteres	Oberes	
d0 - d4	3	0,66	0,27	-0,21	1,52	0,09
d0 - d5	3	-1,13	0,08	-1,38	-0,87	0,001
d0 - d6	3	-3,43	0,40	-4,72	-2,15	0,003
d0 - d7	3	-2,42	0,23	-3,16	-1,68	0,002

**Tabelle 6: Signifikanztest zur Lagerung über 1 Woche bei Raumtemperatur**

Lysispuffer wurde mit 60:1 mit Baculovirus-Zellkulturüberstand versetzt. In diesem gepaarten t-Test werden die Mittelwerte des Ausgangstages mit denen von Tag 4 bis Tag 7 nach einer Lagerung bei Raumtemperatur verglichen. Hier wird ein signifikanter Verlust der Virus-DNA ab dem fünften Tag deutlich.

In Abbildung 9 werden die Amplifikationskurven von den Aliquots am fünften, sechsten und siebten Tag zusammen mit einer positiven und einer negativen Kontrolle in F3/F1 gezeigt. Die schwarzen Kurven der Aliquots, die bei 4°C gelagert wurden, steigen in der

Fluoreszenz früher an als die, die bei Raumtemperatur gelagert wurden. Dies bedeutet, dass sie einen höheren Gehalt an Baculovirus-DNA haben. Außerdem verlaufen sie fast deckungsgleich, während die bei Raumtemperatur gelagerten Aliquots eine größere Varianz zeigen. Da die negative Kontrolle keinen Fluoreszenzanstieg zeigt, kann eine Kontamination ausgeschlossen werden.



**Abbildung 9: PCR-Amplifikationskurve mit Proben unterschiedlicher Lagerungstemperaturen**

Es wurde Lysispuffer 60:1 mit Baculovirus-Zellkulturüberstand versetzt und für acht Tage entweder bei 4°C oder Raumtemperatur (RT) gelagert. An jedem Messtag wurde Virus-freies Zellkulturmedium als Tripletansatz mit dem Baculovirus-versetzten Lysispuffer automatisch aufgereinigt. In der Amplifikationskurve der Echtzeit-PCR werden Aliquots der Tage 5, 6 und 7, sowie die Positivkontrolle (P) und die Negativkontrolle (N) dargestellt. Mit  $\Delta cp$  ist die Differenz zwischen den Aliquots, die bei Raumtemperatur und denjenigen, die bei Kühlschranktemperatur gelagert wurden, eingezeichnet. Gemessen wurde in F3/F1, auf der x-Achse ist die Zyklusnummer und auf der y-Achse die relative Fluoreszenzeinheit aufgetragen.

#### 3.4.3 Reproduzierbarkeit des Baculovirus-Lysispuffer-Ansatzes

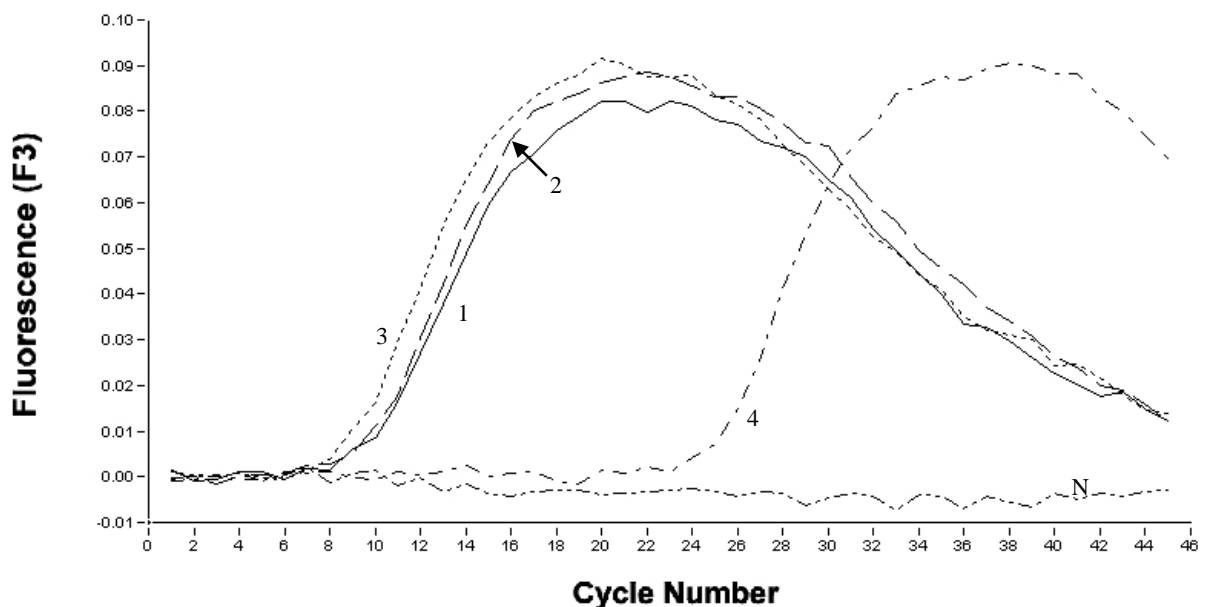
Es wurde in diesem Versuch überprüft, ob sich die Ergebnisse zur Haltbarkeit über eine Woche gelagerten mit Baculovirus-versetzten Lysispuffer reproduzieren lassen. Dazu wurde ein Ansatz Lysispuffer mit Baculovirus-Zellkulturüberstand in vier Aliquots

separiert und jedes Aliquot als dreifacher Ansatz getestet. Der dreifache Ansatz soll Messungenauigkeiten ausgleichen; aus den drei Messergebnissen wurde ein Mittelwert für jedes Aliquot gebildet. Nach dem Shapiro-Wilke-Test liegt eine Normalverteilung vor.

Die Mittelwerte der Aliquots liegen bei 23,2 cp an Tag 0 und 24,4 cp an Tag 7. Die Differenz innerhalb der sieben Tage beträgt 1,2 cp mit einer Standardabweichung von 1,8 cp. Der p-Wert wurde mit 0,26 berechnet und ist somit nicht signifikant. Eine Differenz von 1,2 cp ist bei der Echtzeit-PCR nicht relevant.

#### 3.5 Herstellung einer Standardkurve

Zur Herstellung einer Standardkurve, die zur späteren Quantifizierung von Baculovirus-DNA benötigt wurde, wurde das lange Baculovirus-Amplifikat in kompetente *E.coli*-Zellen inseriert. Die Echtzeit-PCR zeigt, dass neun von zehn *E.coli*-Klonen das entsprechende DNA-Fragment des Baculovirus in ausreichender Menge aufgenommen haben (s. Ausschnitt in Abbildung 10). In der PCR erscheint der Signalanstieg der Klone zwischen 5,3 und 8,9 crossing points. Nur Klon 4 hat zu wenig Baculovirus-DNA aufgenommen und zeigt einen crossing point von 22,9; er wurde deshalb verworfen. Von den anderen wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits die Plasmide isoliert.



**Abbildung 10: Nachweis der Insertion der Baculovirusfragmente in der Echtzeit-PCR**

Amplifikationskurve der Klone 1, 2, 3 und 4 mit Negativkontrolle (N) zur Überprüfung der inserierten Menge an Baculovirus-DNA gemessen in Kanal F3. Die x-Achse gibt die Zyklusnummer wider und die y-Achse die relative Fluoreszenzeinheit.

Der Plasmidgehalt wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt; gleichzeitig wurde auch die Reinheit der isolierten DNA über den Quotienten 260 nm/280 nm festgehalten. Die neun Aliquots wurden vermischt, so dass ein einheitlicher Plasmidgehalt entstand. Davon wurden dann 2 µl Plasmidlösung zur Messung eingesetzt.

Messergebnisse:	bei 260 nm:	1,048
	bei 280 nm:	0,568
	Quotient 260 nm/280 nm:	1,85
	ng/µl:	52,4

Das Plasmid mit dem Insert ist 3931 bp groß, so dass sich nach den Formeln

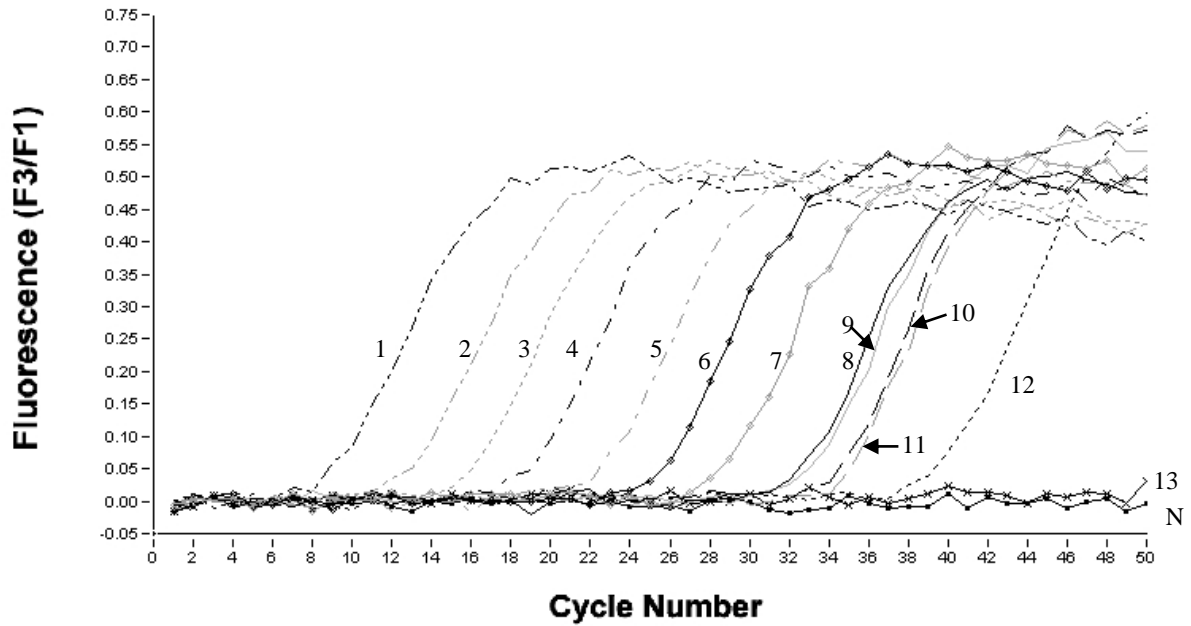
$$3931 \text{ bp} \times 660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 2,6 \times 10^6 \text{ und } \frac{52,4 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 10^{-9}}{2,6 \times 10^6} = 1,2 \times 10^{10} \text{ Kopien}/\mu\text{l}$$

Baculovirus-DNA in der Plasmidlösung befanden.

Die Lösung wurde mit *Aqua ad iniectabilia* so verdünnt, dass sie  $10^9$  Kopien/Ansatz ( $2 \times 10^{11}$  Kopien/ml) enthielt, aliquotiert und bei -18°C tiefgefroren.

Eine Verdünnungsreihe der Plasmide mit den Verdünnungsstufen  $10^9$ - $10^{-1}$  Kopien/Ansatz sowie 50 und 25 Kopien/Ansatz wurde mit dem langen Baculovirus-Amplifikat in einer Echtzeit-PCR amplifiziert (s. Abbildung 11), um daraus eine Standardkurve zu erstellen.

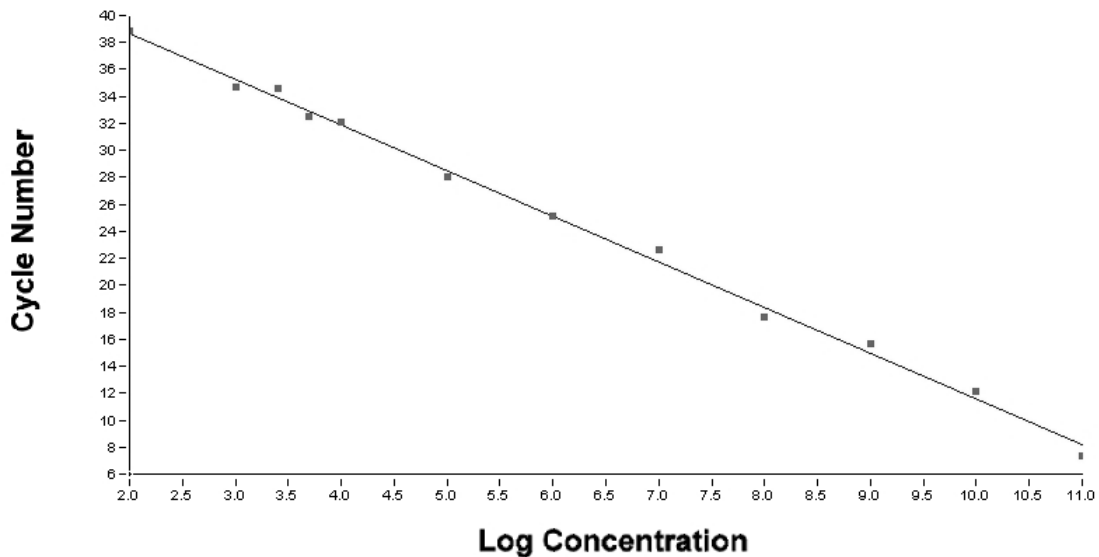
Mit dieser Standardkurve konnten alle nachfolgenden Baculovirus-Proben quantifiziert werden. Über die Formel  $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$  lässt sich aus der Steigung der Standardkurve die Effizienz E der PCR berechnen. Die Standardkurve hat einen Anstieg von -3,385; einen Achsenabschnitt von 45,43 cp mit einem Fehler von 0,166 und einem Regressionskoeffizient r von -1 und somit einen linearen negativen Anstieg (s. Abbildung 12).



**Abbildung 11: PCR Amplifikationskurve der Plasmidverdünnungsreihe zur Standardisierung der Baculovirus-DNA**

1–8: logarithmische Verdünnung mit  $10^9$  K/A bis  $10^2$  K/A; 9: 50 K/A; 10: 25 K/A; 11 – 13 : logarithmische Verdünnung mit  $10^1$  bis  $10^{-1}$  K/A; N: Negativkontrolle

Abgebildet ist die Amplifikationskurve einer Verdünnungsreihe von Baculovirus-Plasmiden, die als Standardkurve zur weiteren Quantifizierung der Baculovirus-DNA verwendet wurde. Gemessen wurde in F3/F1 (x-Achse: Zyklusnummer, y-Achse: relative Fluoreszenzeinheit).



**Abbildung 12: Logarithmische Darstellung der Standardkurve**

Hier werden die einzelnen Messwerte der Standardkurve logarithmisch mit der linearen Regressionsgeraden dargestellt. Auf der x-Achse ist die Konzentration aufgetragen, auf der y-Achse die Zyklusnummer. Möglichst wenig Punkte sollten von der Geraden abweichen.

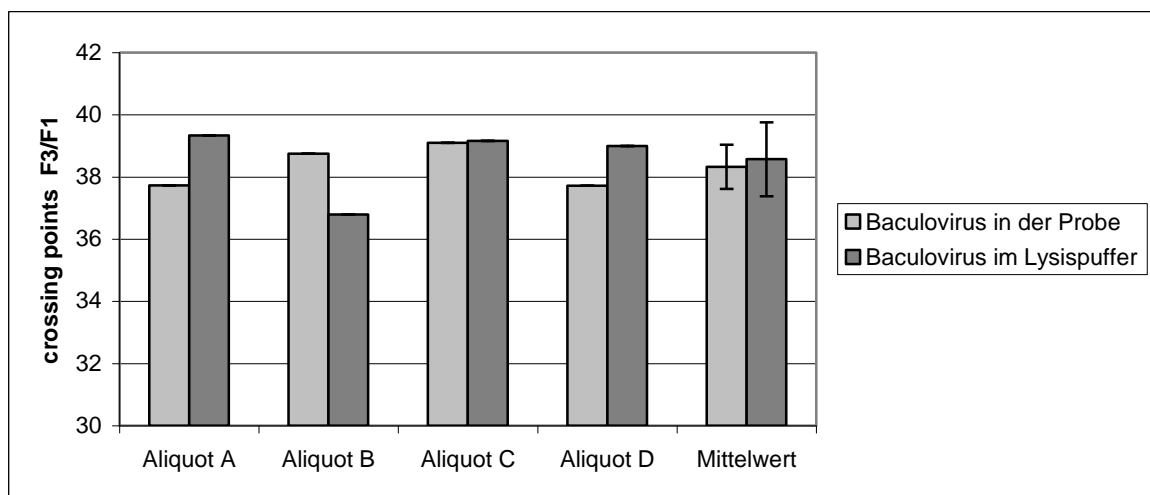


### 3.6 Vergleich zwischen Baculovirus im Lysisbuffer und als Probe

Der Versuch vergleicht, ob es zu einem signifikanten DNA-Verlust kommt, wenn der Baculovirus-Zellkulturüberstand in den Lysisbuffer des automatischen DNA-Extraktionsverfahrens gegeben wird anstatt die DNA als normale Probe zu extrahieren. Die Mittelwerte, die von den vier Aliquots gebildet wurden, betragen für die Baculovirus-DNA in der Probe 38,3 cp und für die Baculovirus-DNA in dem Lysisbuffer 38,6 cp. Der gepaarte t-Test ergibt einen Wert 0,78. Somit ist kein signifikanter Unterschied feststellbar, und es gibt keinen nennenswerten Verlust an DNA, wenn der Zellkulturüberstand in den Lysisbuffer gegeben und aufgearbeitet wird. Das 95%-Konfidenzintervall beträgt bei dem Mittelwert für das Baculovirus im Lysisbuffer 37,4-39,8 crossing points und bei dem Baculovirus als normale Probe 38,1-39,0 crossing points.

Die Standardabweichung der crossing point-Mittelwerte beträgt bei der Baculovirus-DNA, die als Probe extrahiert wurde, 0,7 cp und bei der Baculovirus-DNA aus dem Lysisbuffer 1,2 cp. Damit ist die Streuung bei dem Lysisbuffer höher bei einem ähnlichen Mittelwert (s. Abbildung 13).

Im Shapiro-Wilk-Test hatte sich eine Normalverteilung gezeigt.



**Abbildung 13: Crossing points bei der Extraktion als Probe oder im Lysisbuffer**

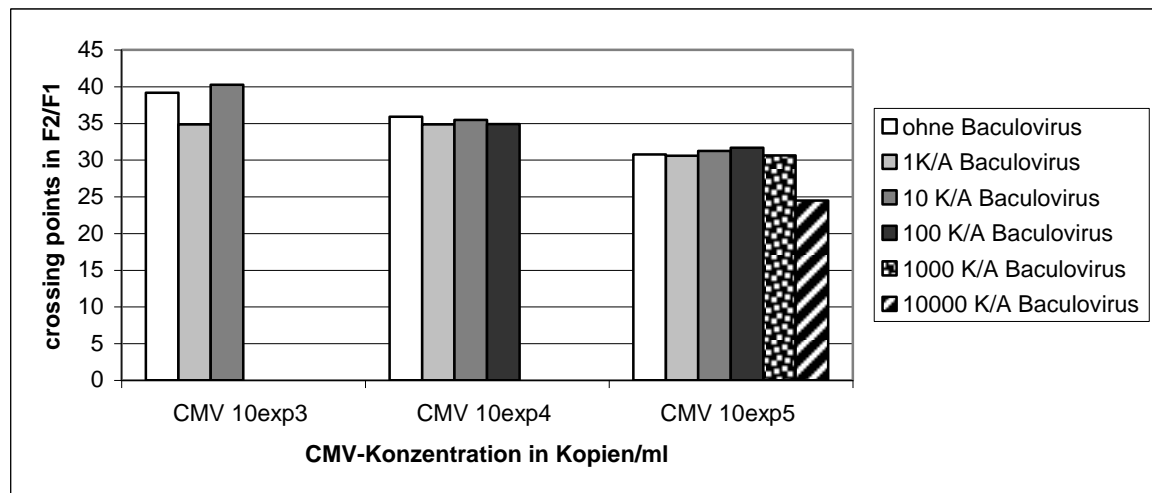
In gleicher Konzentration (ca. 10 Kopien/Ansatz, 2000 Kopien/ml) wurde die Baculovirus-DNA als Probe mit normalem Lysisbuffer und im Vergleich in den Lysisbuffer hinzugegeben. In beiden Fällen wurde die Baculovirus-DNA in einem automatisierten Verfahren isoliert. Bei den Proben, bei denen Baculovirus in den Lysisbuffer hinzugefügt wurde, diente Virus-freies Zellkulturmedium als Probe. Die Mittelwerte wurden aus den Aliquots A bis D gebildet und sind mit dem 95%-Konfidenzintervall angegeben.

### 3.7 Interferenz

Um eine Wechselwirkung zwischen Baculovirus und den humanpathogenen Viren zu identifizieren und die Konzentration von Baculovirus bestimmen zu können, die keine Inhibition des humanpathogenen Virus verursacht, aber stabil reproduzierbar ist, wurden verschiedene Konzentrationen HSV und CMV mit verschiedenen Konzentrationen Baculovirus getestet.

Im Überblick (s. Abbildung 14) stellt sich zunächst heraus, dass hohe Konzentrationen an Baculovirus die niedrigen Konzentrationen an HSV und CMV hemmen. Dies ist beispielhaft an CMV dargestellt; bei HSV verhält es sich ähnlich (hier nicht dargestellt). Die Konzentrationen von  $10^2$  Kopien/ml an HSV und CMV lagen unterhalb der Nachweisgrenze und konnten selbst in der Kontrolle ohne Baculovirus nicht amplifiziert werden. Die Konzentration von  $10^4$  Kopien/Ansatz (ca.  $2 \times 10^6$  Kopien/ml) Baculovirus war so hoch, dass nur noch die höchste Konzentration von HSV und CMV mit einer geringen Ausbeute amplifiziert werden konnte, also teilinhibiert wurde. So liegt bei der CMV-Konzentration von  $10^5$  Kopien/ml auch bei Zugabe von bis zu  $10^3$  Kopien/Ansatz Baculovirus der crossing point bei ca. 32 cp. Bei der Konzentration von  $10^4$  Kopien/Ansatz Baculovirus sinkt der crossing point von CMV auf 24 cp.

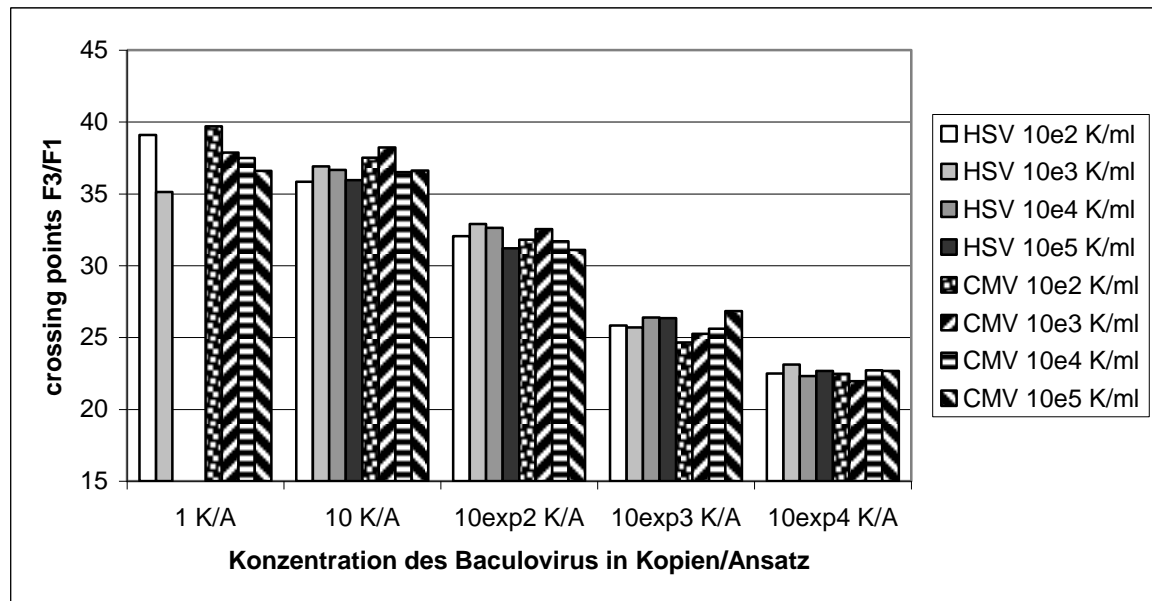
Bei einer Baculovirus-Konzentrationen von 10 Kopien/Ansatz (etwa  $2 \times 10^3$  Kopien/ml) werden alle CMV-Konzentrationen ohne wesentlichen Unterschied zur Kontrolle amplifiziert.



**Abbildung 14: Verschiedene CMV-Konzentration amplifiziert mit verschiedenen Baculovirus-Konzentrationen**

Fluoreszenzmessung der crossing points beispielhaft von CMV in F2/F1 bei verschiedenen Konzentrationen ( $1 \cdot 10^4$  Kopien/Ansatz [K/A]) von Baculovirus, das automatisch mit dem Lysispuffer bei der DNA-Isolation zu den Proben pipettiert wurde. Bei mehr als einem Messergebnis ist der Mittelwert angegeben. Die Konzentration CMV  $10^2$  Kopien/ml wurde nicht dargestellt, da sie sich unterhalb der Nachweisgrenze befand.

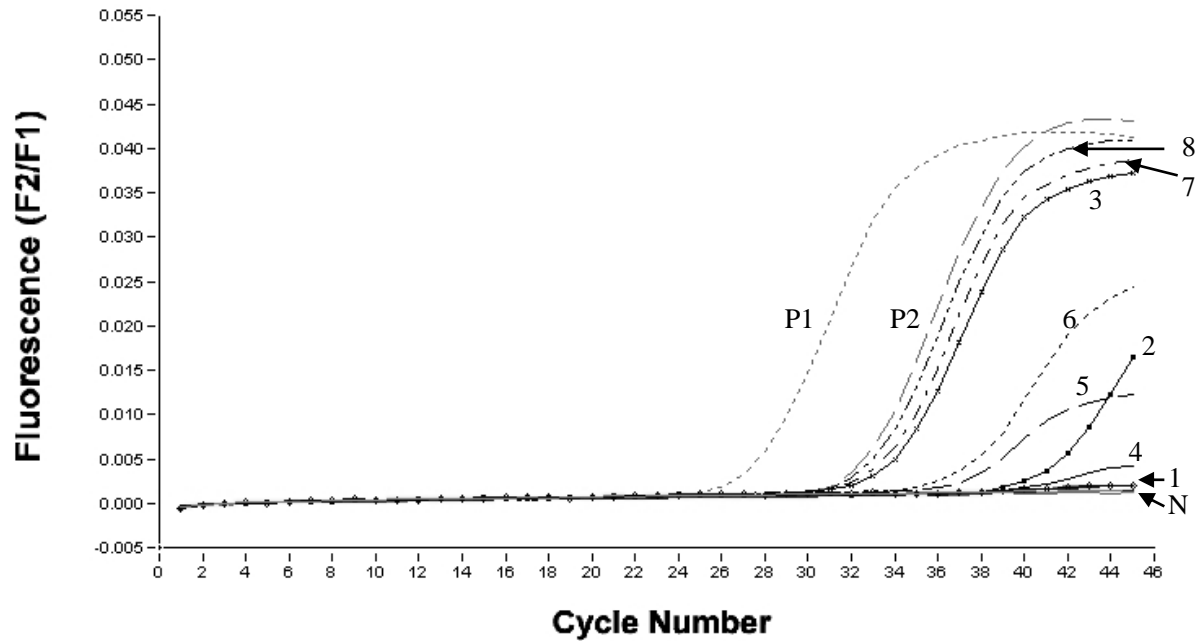
Anders stellt sich die Situation dar, wenn man die Werte des Baculovirus in F3/F1 bei den verschiedenen Konzentrationen von HSV und CMV untersucht. Das Baculovirus soll zwar der schwächere Partner im System sein, muss aber als interne Kontrolle stabil amplifiziert werden. Dies ist bei einer Konzentration von 1 Kopie/Ansatz (ca. 200 Kopien/ml) Baculovirus im Lysispuffer nicht der Fall. Er wird von HSV in den Konzentrationen  $10^4$  und  $10^5$  Kopien/ml unterdrückt. Außerdem sind die Schwankungen zwischen 35,1 und 39,7 crossing points in dieser Baculoviruskonzentration sehr hoch. Ab einer Konzentration von 10 Kopien/Ansatz (ca.  $2 \cdot 10^3$  Kopien/ml) lässt sich das Baculovirus gut reproduzieren. Auch die Schwankungsbreite ist geringer und liegt zwischen 35,9 und 38,2 crossing points. Die Varianz sinkt mit steigender Konzentration des Baculovirus (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Verschiedene Konzentrationen Baculovirus in Abhängigkeit von HSV und CMV-Konzentrationen**

Dargestellt sind die crossing points (F3/F1) des Baculovirus in den Konzentrationen von  $1-10^4$  Kopien/Ansatz in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen HSV und CMV ( $10^2-10^5$  Kopien/ml). Das Baculovirus wurde während der automatischen DNA-Extraktion im Lysispuffer zu den Proben hinzugegeben. Bei mehr als einem Messergebnis ist der Mittelwert dargestellt.

Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurden die humanpathogenen Viren HSV und CMV zunächst unter Standardbedingungen mit unverändertem Lysispuffer in einem automatisierten Verfahren aufgereinigt. Anschließend wurden Proben derselben Verdünnungsreihe noch einmal mit 10 Kopien/Ansatz (etwa  $2 \times 10^3$  Kopien/ml) Baculovirus im Lysispuffer als interne Kontrolle in demselben Verfahren aufgereinigt. Die Abbildung 16 zeigt den Anstieg der CMV-Fluoreszenz in F2/F1. Während die Fluoreszenz der positiven CMV-Kontrollen beide ansteigen, bleibt die Fluoreszenz der negativen Kontrolle innerhalb der Grundfluoreszenz. Es ist in Abhängigkeit von der CMV-Konzentration ein unterschiedlicher Fluoreszenzanstieg zu beobachten.

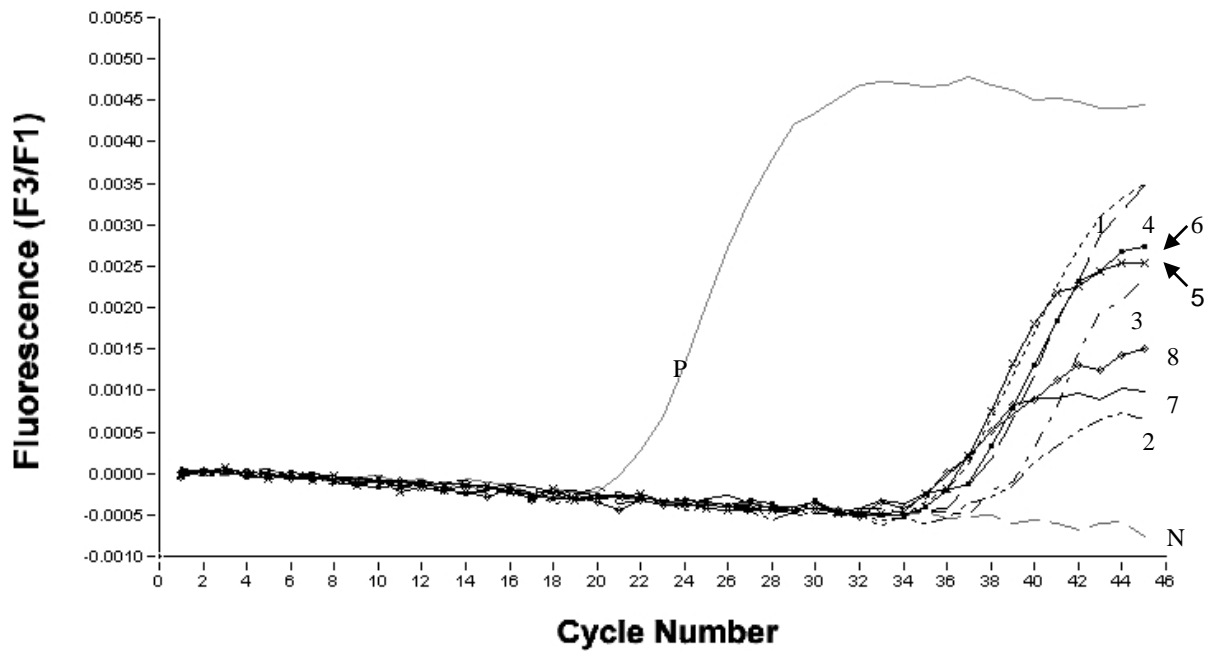


**Abbildung 16: PCR-Amplifikationskurven von CMV mit 10 Kopien/Ansatz Baculovirus im Lysispuffer**

ohne Baculovirus:	1: CMV $10^3$ Kopien/ml,
	2: CMV $10^4$ Kopien/ml,
	3: CMV $10^5$ Kopien/ml
Mit 10Kopien/Ansatz Baculovirus:	4:CMV $10^3$ Kopien/ml Probe B,
	5: CMV $10^4$ Kopien/ml Probe A
	6: CMV $10^4$ Kopien/ml Probe B,
	7: CMV $10^5$ Kopien/ml Probe A,
	8: CMV $10^5$ Kopien/ml Probe B
Negative Kontrolle	N
Positive Kontrolle	P1 ( $10^6$ Kopien/Ansatz CMV)
Positive Kontrolle	P2 ( $10^4$ Kopien/Ansatz CMV)

Die Amplifikationskurven zeigen die Fluoreszenz des CMV in verschiedenen Konzentrationen mit 10 Kopien/Ansatz Baculovirus und als Kontrolle ohne Zugabe des Baculovirus, das automatisch während der DNA-Isolation mit dem Lysispuffer hinzugefügt wurde, gemessen in F2/F1 (x-Achse: Zyklusnummer, y-Achse relative Fluoreszenzeinheit). Probe A und B bezeichnen die beiden unterschiedlichen Proben des doppelten Ansatzes.

Die Konzentration von  $10^2$  Kopien/ml lag sowohl bei HSV als auch bei CMV unterhalb der Nachweisgrenze. Bei CMV sind die Verdünnungsschritte deutlich zu erkennen, und außer bei der Konzentration  $10^4$  Kopien/ml (38,9 cp ohne Baculovirus zu durchschnittlich 35,5 cp mit Baculovirus) besteht kein Unterschied zwischen dem unveränderten Lysispuffer und dem Baculovirus-haltigen Lysispuffer. Bei einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ml CMV lag der crossing point bei 40,7 ohne Baculovirus und bei 40,2 cp mit Baculovirus. In der höchsten gemessenen Konzentration ( $10^5$  Kopien/ml) CMV lagen die crossing points bei 30,7 ohne bzw. bei 31,2 mit Baculovirus. Ähnliche Werte wurden für das HSV erzielt.



**Abbildung 17: PCR-Amplifikationskurven des Baculovirus mit verschiedenen CMV-Konzentrationen**

Baculovirus im Lysispuffer (10 K/Ansatz) mit:

- 1:  $10^2$  Kopien/ml CMV Probe A,
- 2:  $10^2$  Kopien/ml CMV Probe B
- 3:  $10^3$  Kopien/ml CMV Probe A,
- 4:  $10^3$  Kopien/ml CMV Probe B,
- 5:  $10^4$  Kopien/ml CMV Probe A,
- 6:  $10^4$  Kopien/ml CMV Probe B,
- 7:  $10^5$  Kopien/ml CMV Probe A,
- 8:  $10^5$  Kopien/ml CMV Probe B
- P: Positivkontrolle Baculovirus,
- N: Negativkontrolle

Bei diesen Amplifikationskurven sind die Fluoreszenzanstiege des Baculovirus mit verschiedenen CMV-Konzentrationen zu sehen, gemessen in F3/F1 (x-Achse: Zyklusnummer, y-Achse relative Fluoreszenzeinheit). Hierbei wurden jeweils 10 Kopien/Ansatz Baculovirus mit dem Lysispuffer automatisch während der DNA-Extraktion den CMV-Proben hinzugefügt. Probe A und B bezeichnen die beiden unterschiedlichen Proben des doppelten Ansatzes.

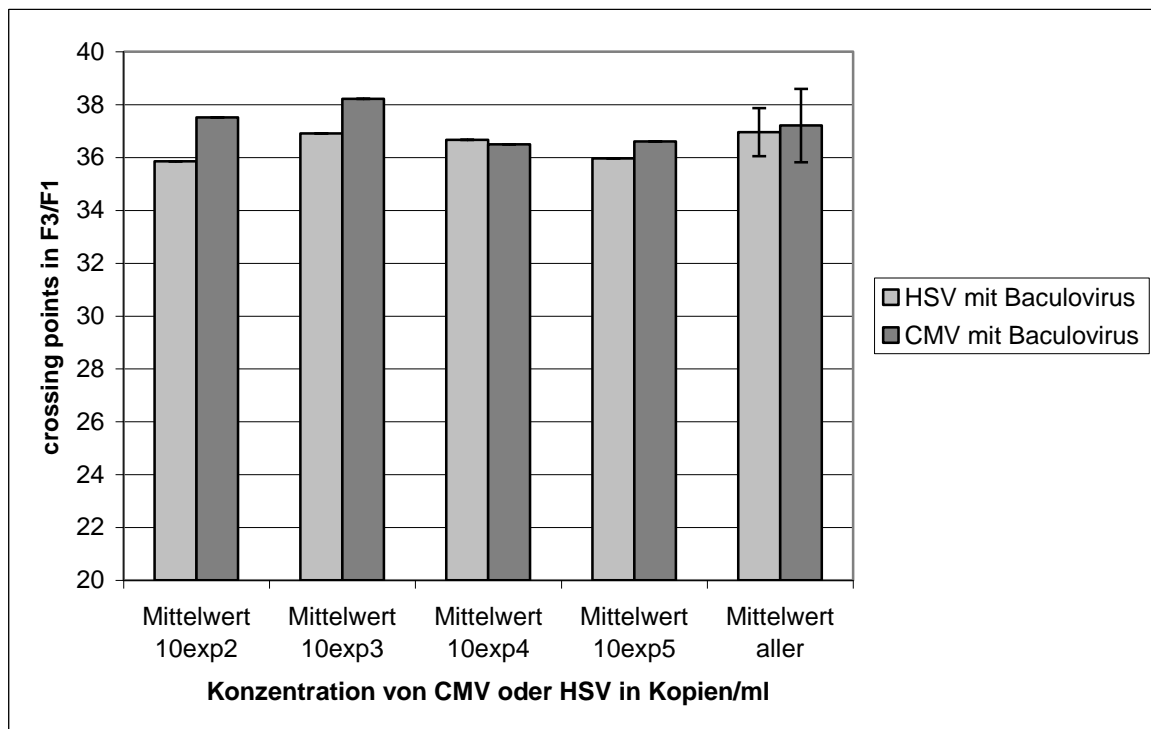
Für das Baculovirus sind die Amplifikationskurven in Abbildung 17 dargestellt, gemessen in F3/F1. Während die Positivkontrolle ab dem 20. Zyklus ansteigt, erkennt man bei der Negativkontrolle keinen Fluoreszenzanstieg. Es lag also keine Kontamination vor, und die PCR konnte erfolgreich durchgeführt werden. Der Fluoreszenzanstieg für das Baculovirus im Lysispuffer ist um den 36. Zyklus zu beobachten, außer bei je einer Probe der CMV-Konzentration von  $10^2$  Kopien/ml und  $10^3$  Kopien/ml. Hier erfolgt der Anstieg des Fluoreszenzsignals vom Baculovirus verspätet bei ca. 38 Zyklen.

Beim *Herpes simplex*-Virus liegt der Mittelwert vom Baculovirus (10 Kopien/Ansatz) gemessen über alle HSV-Konzentrationen bei 36,4 cp mit einer Standardabweichung von 1,1 cp. Das 95%-Konfidenzintervall liegt zwischen 35,4 cp und 37,3 cp. Hierbei ist kein

### 3 Ergebnisse

Zusammenhang mit der HSV-Konzentration, wie z. B. eine Zunahme der crossing points mit steigender HSV-Konzentration, zu erkennen. Dies würde auf eine Beeinflussung des Baculovirus durch HSV hinweisen.

Ganz ähnlich sieht es für den Fluoreszenzanstieg des Baculovirus zusammen mit CMV aus. Als Mittelwert ergibt sich 37,0 cp mit einer Standardabweichung von 1,7 cp. Das 95%-Konfidenzintervall beträgt hier 35,7-38,4 cp. Wieder ist kein Zusammenhang zu der CMV-Konzentration bei den etwas größeren Schwankungen festzustellen.



**Abbildung 18: Crossing points des Baculovirus in Abhängigkeit von HSV und CMV**

Die Mittelwerte der crossing points von 10 Kopien/Ansatz Baculovirus gemessen in F3/F1 sind in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen HSV und CMV dargestellt. Außerdem ist der Mittelwert über alle Konzentrationen mit den dazugehörigen 95%-Konfidenzintervallen angegeben. Das Baculovirus wurde mit dem Lysispuffer automatisch während der DNA-Extraktion hinzugegeben.

Da sich die Konfidenzintervalle der Baculoviruskonzentrationen bei HSV und CMV überschneiden, ist kein signifikanter Unterschied bei der Reproduzierbarkeit des Baculovirus zu erkennen. Bei der Zugabe von Baculovirus als interne Kontrolle in der Konzentration 10 Kopien/Ansatz macht es also keinen Unterschied, zu welchem humanpathogenen Virus es hinzugefügt wird (s. Abbildung 18).

### 3.8 Patientenproben

Insgesamt wurden 189 Patientenproben untersucht, davon wurden acht dieser Proben sowohl auf HSV als auch auf CMV untersucht, da die Patienten unter einer Doppelinfektion mit HSV und CMV litten. Von diesen 189 Patientenproben wurden 19 CMV-Proben und 7 HSV-Proben von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da durch die Lagerung und den Auftauprozess kein Virus mehr amplifizierbar war.

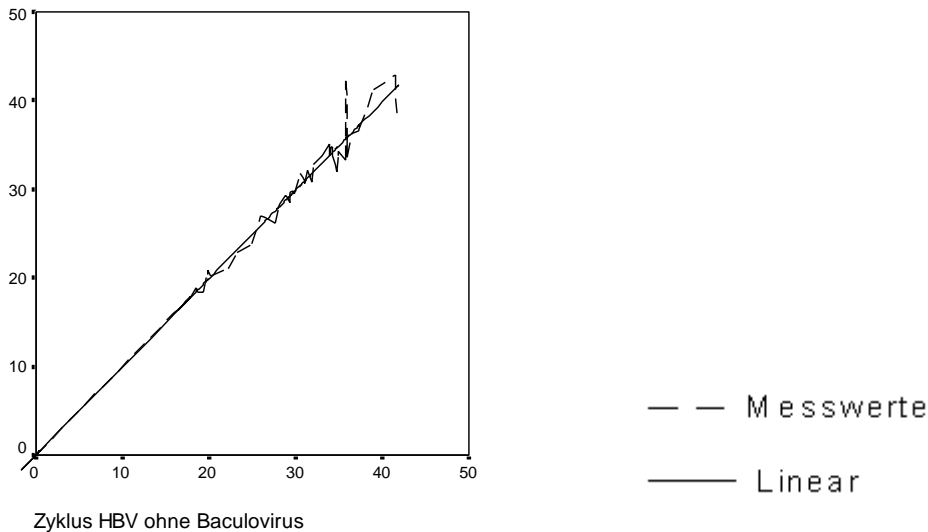
Bei ca. 12% trat eine Inhibition auf, was bedeutet, dass weder Baculovirus noch das humanpathogene Virus nachweisbar waren.

#### 3.8.1 HBV-Patientenproben

Insgesamt wurden 58 Patientenproben getestet. 5 von 58 (6,9%) waren inhibiert, das bedeutet, weder das Baculovirus noch das Hepatitis B-Virus konnten nachgewiesen werden. In zwei Proben (3,5%) konnte in einem der beiden Proben kein Hepatitis B-Virus nachgewiesen werden, weil ihre Viruskonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze lagen. Diese Proben wurden aus der Bewertung herausgenommen.

Die Viruskonzentration war häufig sehr hoch (größer als  $10 \times 10^8$  Kopien/ml), so dass das Baculovirus unterdrückt wurde und kein Signal in F3/F1 gemessen werden konnte. In 11 Proben war das Baculovirus durch das HBV inhibiert, aber noch in der Schmelzkurve nachweisbar und in 24 Proben konnte es gar nicht nachgewiesen werden. Der Mittelwert des Baculovirus betrug 37,3 cp oder 4,2 Kopien/Ansatz mit einer Standardabweichung von 3,6 Kopien/Ansatz und einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 2,4 Kopien/Ansatz und 6,0 Kopien/Ansatz.





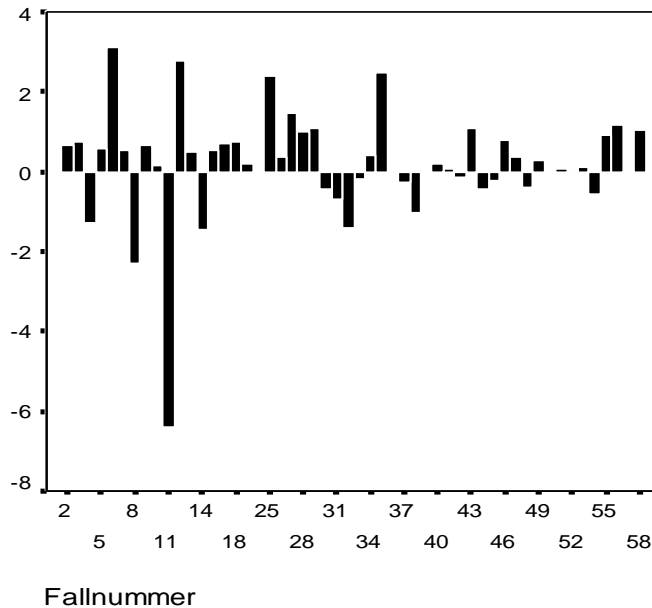
**Abbildung 19: Regressionsgerade zwischen HBV mit und ohne Baculovirus als interne Kontrolle**

In der Regressionsgeraden mit linearer Interpolation wurden die HBV-Patientenproben mit Baculovirus als interne Kontrolle gegen die ohne Baculovirus verglichen. Angegeben ist der Zyklus des Fluoreszenzanstiegs. Die x-Achse zeigt die crossing points des HBV, die y-Achse die crossing points des HBV mit Baculovirus als interne Kontrolle.

Der Mittelwert des HBV ohne Baculovirus lag bei 29,6 cp mit einer Standardabweichung von 6,8 cp und einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 27,7 cp und 31,5 cp. Der Mittelwert der HBV-crossing points mit dem Baculovirus als interne Kontrolle war mit 29,5 cp fast gleich. Hier betrug die Standardabweichung 6,9 cp und das 95%-Konfidenzintervall lag bei 27,6-31,4 cp. Es liegt also eine Überschneidung der Konfidenzintervalle vor.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson liegt bei  $r = 0,979$  und ist bei einem zweiseitigen Niveau von 0,01 signifikant. Diese starke positive Korrelation lässt sich in der Regressionsgeraden erkennen (s. Abbildung 19). Hierfür wurden die crossing points der Patientenproben mit Baculovirus als interne Kontrolle gegen die Patientenproben ohne interner Kontrolle aufgetragen.

Um vergleichen zu können, welchen Einfluss das Baculovirus auf die Messung des HBV hat, wurden die crossing points des HBV mit dem Baculovirus von den crossing points des HBV ohne Baculovirus subtrahiert (s. Abbildung 20). Inhibierte Proben wurden aus der Beobachtung ausgeschlossen, da hier keine Differenz vorliegt. Der Mittelwert der Abweichung beträgt 0,2 cp mit einem 95%-Konfidenzintervall von -0,2 cp bis 0,6 cp.



**Abbildung 20: Crossing point-Differenz zwischen HBV mit und ohne Baculovirus**

Gezeigt ist die Zyklus-Differenz zwischen dem HBV ohne Baculovirus minus dem HBV mit Baculovirus von Patientenproben. Die Proben, die inhibiert wurden, sowie die Proben, die am Rande der Nachweismöglichkeit lagen, wurden aus der Bewertung ausgeschlossen. Man erkennt, dass die Mehrzahl der Balken in die positive Richtung zeigen, die Diagnostik mit Baculovirus also etwas besser funktioniert. Die Differenz von  $\pm 1,5$  Zyklen wurde als Messungenauigkeit bzw. Pipetierfehler gewertet. Auf der x-Achse sind die Probennummer und auf der y-Achse die crossing point-Differenz aufgetragen.

#### 3.8.2 HSV-Patientendaten

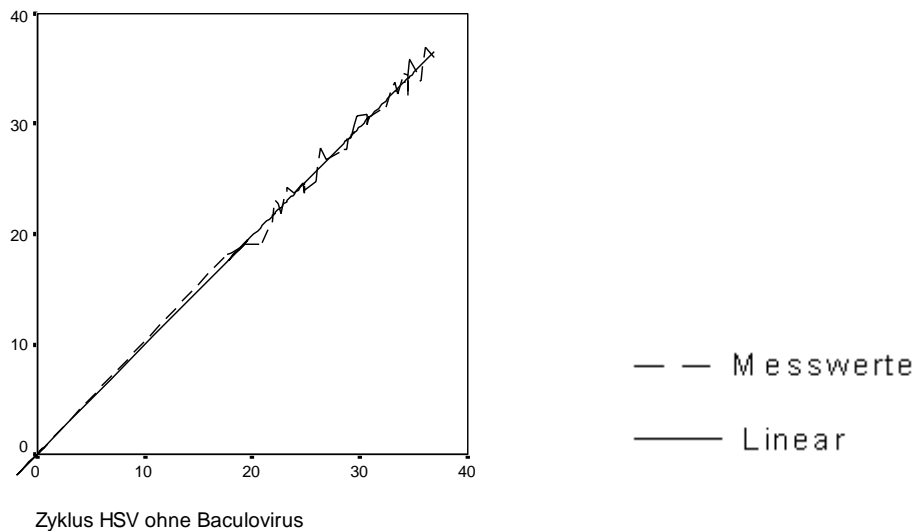
Es wurden 52 HSV-Patientenproben getestet. In 7 Patientenproben (13,5%) konnte auf Grund des Einfrierens und Auftauens kein *Herpes simplex*-Virus mehr nachgewiesen werden. Sie wurden aus der weiteren Auswertung herausgenommen.

In drei Fällen (5,8%) lag eine Inhibition vor, d. h. sowohl das HSV als auch das Baculovirus waren nicht nachweisbar.

In 26,9% der Proben war die HSV-Konzentration so hoch, dass sie das Baculovirus vollständig supprimiert hat; in 11,5% war Baculovirus nur noch in der Schmelzkurve nachweisbar. Der Mittelwert des Baculovirus liegt bei 35,4 cp oder 19,3 Kopien/Ansatz mit einer Standardabweichung von 18,2 Kopien/Ansatz und einem 95%-Konfidenzintervall von 13,0 bis 25,5 Kopien/Ansatz.

Die HSV-Proben, die ohne Baculovirus als interne Kontrolle getestet wurden, haben einen Mittelwert von 26,6 cp mit einer Standardabweichung von 8,9 cp und einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 23,8 cp und 29,3 cp. Durch Zugabe von Baculovirus sinkt der Mittelwert auf 26,3 cp mit einer Standardabweichung von 8,9 cp und einem 95%-Konfidenzintervall bei 23,6 cp bis 29,1 cp.

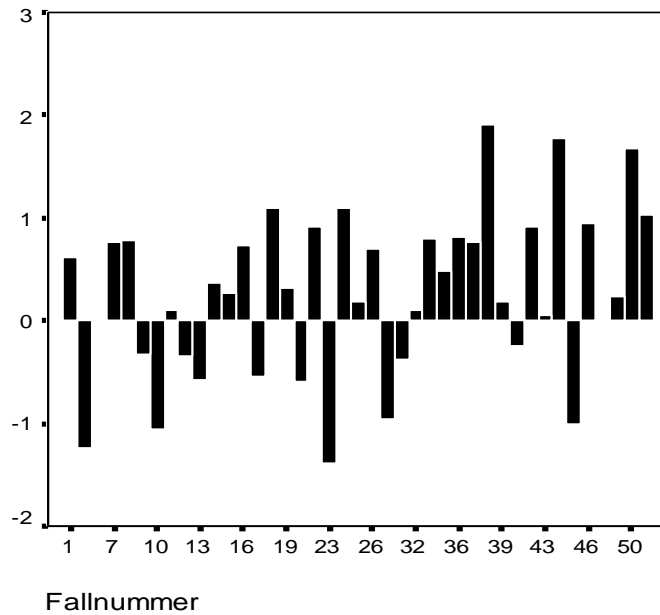
Bei HSV beträgt der Korrelationskoeffizient nach Pearson  $r = 0,996$  und ist auf einem zweiseitigen Niveau von  $p < 0,01$  signifikant. Die Regressionsgerade, bei dem die crossing points von HSV mit Baculovirus gegen die ohne Baculovirus aufgetragen wurden, stellt dies graphisch dar (s. Abbildung 21).



**Abbildung 21: Regressionsgerade zwischen HSV mit und ohne Baculovirus als interne Kontrolle**

Abbildung 21 zeigt die Regressionsgerade mit linearer Interpolation für HSV-haltige Patientenproben mit und ohne Baculovirus. Der Zyklus für die HSV-Probe mit Baculovirus ist in Abhängigkeit gegen die HSV-Probe ohne Baculovirus aufgetragen. Die x-Achse zeigt die crossing points des HSV ohne die Zugabe von Baculovirus und y-Achse nach Zugabe von Baculovirus.

Um noch besser beurteilen zu können, ob das Baculovirus den Nachweis des HSV negativ beeinflusst, wurde die Differenz zwischen den crossing points von HSV ohne Baculovirus mit denen mit Baculovirus gebildet (s. Abbildung 22). Wenn man alle HSV-Proben, bei denen in beiden Messungen kein HSV gefunden wurde (inhibierte Proben und Proben ohne HSV) ausschließt, liegt der Mittelwert der Differenzen bei 0,3 cp, mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,2-0,5 crossing points und einer Standardabweichung von 0,8 cp.



**Abbildung 22: Crossing point-Differenz zwischen HSV mit und ohne Baculovirus**

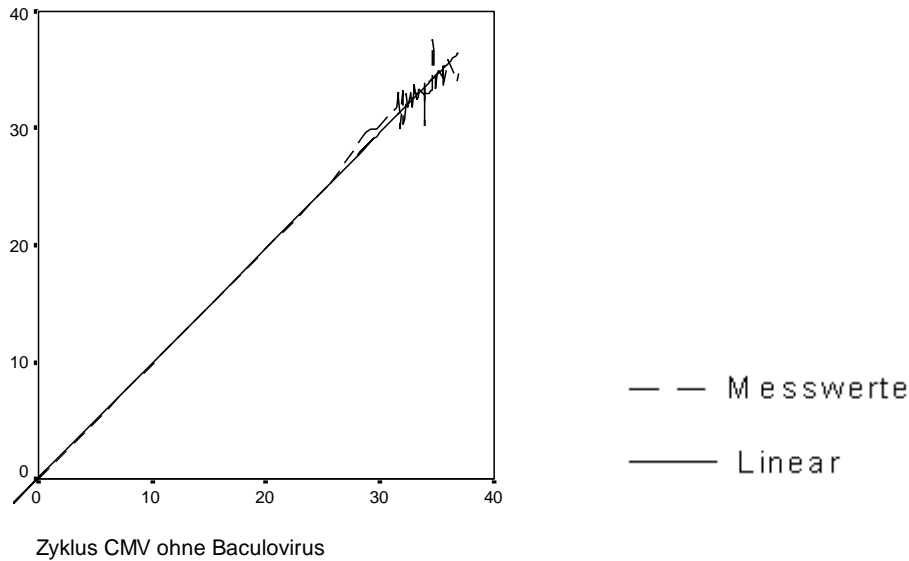
Es sind die Differenzen abgebildet, die sich ergeben, wenn man den Zyklus der HSV-Patientenproben mit Baculovirus von dem Zyklus ohne das zugefügte Baculovirus subtrahiert.

Ein Wert zwischen 1,5 und -1,5 cp wird Ungenauigkeiten in der Testung zugeschrieben. Proben, bei denen Inhibitionen auftraten, das Virus nach dem Tieffrieren zerstört worden ist oder die Viruskonzentration am Rande der Nachweisgrenze lagen, wurden hier nicht berücksichtigt. Auf der x-Achse kann man die Probennummer ablesen und auf der y-Achse die Zyklus-Differenz.

#### 3.8.3 CMV-Patientenproben

Bei 30,9% der ursprünglich 54 getesteten CMV-Patientenproben konnte kein CMV mehr nachgewiesen werden. Die Proben, bei denen kein CMV mehr nachweisbar war, wurden aus der Bewertung herausgenommen und durch 24 weitere positiv-getestete Proben ersetzt. In die Auswertung kamen schließlich 59 Patientenproben, von denen 25,4% Inhibitionen zeigten.

Der Mittelwert des Baculovirus lag bei 34,2 cp oder 22,5 Kopien/Ansatz mit einer Standardabweichung von 20,8 Kopien/Ansatz und einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 16,8 und 28,3 Kopien/Ansatz.



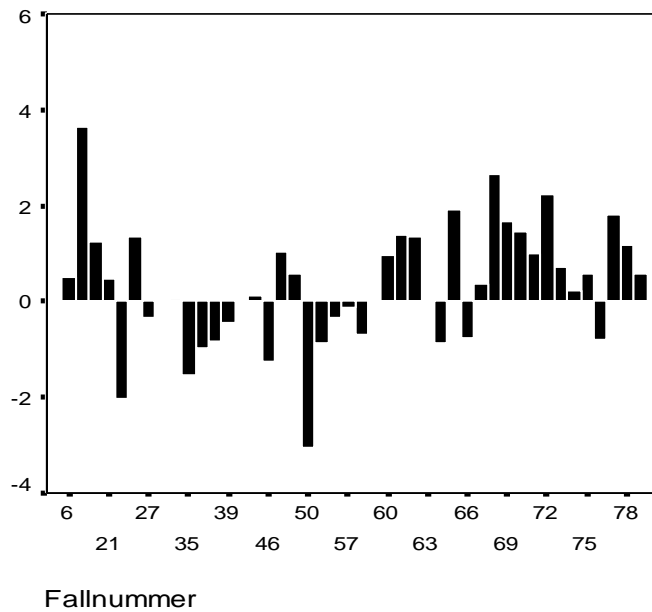
**Abbildung 23: Regressionsgerade zwischen CMV mit und ohne Baculovirus als interne Kontrolle**

In der Regressionsgeraden mit linearer Interpolation wurde der Zyklus der CMV-Patientenproben mit zugesetztem Baculovirus abhängig zu dem Zyklus ohne Baculovirus dargestellt. Auf der x-Achse sind die crossing points des CMV und auf der y-Achse die crossing points des CMV mit Baculovirus als interne Kontrolle abzulesen.

Der Mittelwert von CMV ohne Baculovirus als interne Kontrolle liegt bei 24,2 cp mit einer Standardabweichung von 15 cp und einem 95%-Konfidenzintervall bei 20,1 cp bis 27,8 cp. Wird das Baculovirus als interne Kontrolle hinzugefügt, so verschiebt sich der Mittelwert auf 23,9 cp mit einer Standardabweichung von 14,8 cp und einem 95%-Konfidenzintervall von 20,1 cp - 27,8 cp.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt  $r = 0,942$  und ist auf einem zweiseitigen Niveau von  $p < 0,01$  signifikant. Dies ist auch an der Regressionsgeraden mit linearer Interpolation (s. Abbildung 23) erkennbar. Die crossing points vom CMV mit Baculovirus sind gegen die crossing points vom CMV ohne Baculovirus aufgetragen.

Um den genauen Einfluss des Baculovirus bestimmen zu können, wurde die Differenz zwischen den crossing points von CMV mit und ohne Baculovirus gebildet (s. Abbildung 24). Dazu wurde von den CMV-crossing points ohne Baculovirus die CMV-crossing point mit Baculovirus subtrahiert. Die Proben ohne CMV wurden aus der Wertung herausgenommen. Die mittlere Abweichung liegt bei 0,3 crossing points und einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 0,06 cp und 0,71 cp.



**Abbildung 24: Crossing point-Differenz zwischen CMV mit und ohne Baculovirus**

Auch beim CMV weisen die Differenzen zwischen dem CMV-Zyklus ohne Baculovirus und mit zugefügtem Baculovirus mehrheitlich in die positive Richtung, d. h. mit Baculovirus in der Patientenprobe wird das CMV tendenziell besser nachgewiesen. Schwankungen zwischen den beiden Vergleichsproben von  $\pm 1,5$  cp werden als normale Schwankungen in der Testung angesehen. Auf der x-Achse sind die Probennummer aufgetragen und auf der y-Achse die Zyklus-Differenz.

## 4 Diskussion

Der Diskussionsteil beleuchtet die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und wurde in folgende Punkte gegliedert: Der erste Teil befasst sich mit der Entwicklung der internen Kontrolle, der darauffolgende Abschnitt mit der Implementierung der internen Kontrolle. Im dritten Teil werden die Resultate der Patientenproben diskutiert, und im letzten Abschnitt erfolgt ein Ausblick.

### 4.1 Entwicklung der internen Kontrolle

Wichtig für die Auswahl der internen Kontrolle, hier der Baculovirussequenz, und damit auch für die Auswahl der Primer und Sonden war, dass diese die PCR der humanpathogenen Viren nicht negativ beeinflussen. Eine solche negative Beeinflussung kann u. a. dadurch verursacht werden, dass das dazugegebene Baculovirus bei der Amplifizierung aufgrund seiner Eigenschaften bevorzugt wird. Kleinere Amplifikate werden mit größerer Effizienz amplifiziert (Maaroufi et al, 2006; Long et al., 2008); ein 12-facher Unterschied in der Amplifikationseffizienz zwischen 200 bp und 1000 bp konnte beschrieben werden (McCulloch et al., 1995). Die Amplifikatlänge ist bei den humanpathogenen Viren relativ divergent: sie reicht von 185 bp bis 510 bp. Um eine Selektion bei der Vervielfältigung zu vermeiden, wurden entsprechend den Amplifikatlängen der humanpathogenen Viren drei unterschiedlich lange Baculovirussequenzen hergestellt. Der Sense-Primer wurde bei allen drei Amplifikatlängen beibehalten, und für jede Länge wurde ein anderer Antisense-Primer erstellt.

Auch der Guanin-Cytosin-Gehalt wurde weitestgehend dem Durchschnitt der humanpathogenen Viren angepasst, da auch der Guanin-Cytosin-Gehalt Auswirkungen auf die Amplifikationseffizienz hat (Phan et al., 1998; Elnifro et al., 2000; Hodgson et al., 2007).

Es wurden Hybridisierungssonden für das Baculovirus ausgewählt, da es sich bei der Mehrzahl der in der Diagnostik bereits verwendeten Sonden um Hybridisierungssonden handelt. Nur für die Adenoviren werden TaqMan-Sonden verwendet. Da sich die Messkanäle der Hybridisierungssonden und der TaqMan-Sonden überschneiden, kann hier nicht die Baculovirus-basierte, simultan durchgeführte interne Kontrolle verwendet werden. Für sie müsste im Verlauf eine eigene interne Kontrolle mit TaqMan-Sonden entwickelt werden, wofür das Baculovirus-Amplifikat verwendet werden kann. Es wurde bereits eine interne Kontrolle für *Cryptosporidium spp.* beschrieben, die eine TaqMan-

Sonde als interne Kontrolle verwendet, die aus einer donor-Sonde, einer acceptor-Sonde und einem Quencher besteht, der das Signal unterdrückt (Jothikumar et al., 2009).

Da das humane Genom in vielen Sequenzen mit dem des Baculovirus übereinstimmt, war es zwar schwierig aber letztlich erfolgreich, passende Primer und Sonden zu finden, die spezifisch für das Baculovirus sind und nicht am menschlichen Genom binden. Allein mit den ausgewählten Primern war dies nicht möglich, da es hier zu einer Amplifikation von humanem Genom aus virus-freien Proben kam (vgl. Elektrophorese Gel Abbildung 6). Es entstanden sowohl Produkte, die eine andere Länge als das Baculovirus aufwiesen, als auch der selben Länge, die somit nicht von der internen Kontrolle zu unterscheiden sind. Letztere können zu falsch-positiven Ergebnissen bei der internen Kontrolle führen, da sie in der Gelelektrophorese nicht von der internen Kontrolle zu unterscheiden sind. Die unerwünschten Nebenprodukte, die durch Amplifikation des humanen Genoms entstehen, verbrauchen Nukleotide und binden Polymerase, die für die gewünschte Amplifikation von humanpathogenen Viren und der internen Kontrolle nicht zur Verfügung stehen. In den Vorversuchen und in den ca. 200 Versuchen mit Patientenproben konnte aber keine Minderung der Ergebnisse erkannt werden.

Die Verwendung von Hybridisierungssonden erhöht die Spezifität der Amplifikation der internen Kontrolle und kann eine sichere Unterscheidung zwischen menschlichem und viralem Genom ermöglichen. Durch Verwendung von Hybridisierungssonden ist eine Übereinstimmung zwischen Primern und Sonden mit dem Amplifikat von über 47 bp notwendig. Die gleichen Patientenproben des Elektrophorese-Gels (s. Abbildung 6) wurden auch mit spezifischen Hybridisierungssonden getestet (s. Abbildung 4 und Abbildung 5). Hier kann sowohl in der Amplifikationskurve als auch in der Schmelzkurve eine ungewollte Amplifikation und Nachweis von menschlichem Genom ausgeschlossen werden. Im Verlauf konnte bei den Versuchen kein negativer Einfluss und keine Kreuzreaktion durch die Zugabe der internen Kontrolle festgestellt werden.

### **4.2 Implementierung der internen Kontrolle**

Nach erfolgreicher Identifizierung einer geeigneten Sequenz für die interne Kontrolle mussten die Rahmenbedingungen, wie Lagerung und Herstellung einer Standardkurve sowie die Einstellung der Konzentration der internen Kontrolle erfolgen, um sie erfolgreich einsetzen zu können.



Eine längere Lagerbarkeit führt zu weniger Arbeitsaufwand, da größere Mengen hergestellt werden können. In den Versuchen zeigte sich, dass sich die isolierte DNA nicht über mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahren lässt. Über den Zeitraum von 10 Wochen kam es zu einem Abfall an Baculovirus-DNA, der sich in der Echtzeit-PCR im Anstieg der crossing points darstellte (s. Abbildung 7). Allerdings konnte in einem Versuch gezeigt werden, dass sich isolierte Baculovirus-DNA über eine Woche im Kühlschrank ohne signifikanten Verlust lagern lässt (vgl. Tabelle 5). Auch bei den anschließenden Versuchen mit Patientenproben wurde die interne Kontrolle eine Woche ohne Verlust von DNA im Kühlschrank aufbewahrt. In der Literatur wird empfohlen DNA bei einer maximalen Temperatur von 4°C und nicht länger als fünf Tagen zu lagern oder eine anderweitige Konservierung durch Lyophilisierung oder tieffrieren zu verwenden (Burggraf und Olgemüller, 2004; Villanova et al., 2007).

Zur genauen Einstellung der Baculovirus-Konzentration im Lysispuffer mussten noch zwei Schritte erfolgen: zum einen musste eine Standardkurve zur Quantifikation des Baculovirus erstellt werden und zum anderen musste überprüft werden, ob sich ein Unterschied in der DNA-Extraktion ergibt, wenn das Baculovirus normal als Probe verarbeitet wird oder in den Lysispuffer hinzugegeben wird.

Zur Herstellung einer Standardkurve wurde zunächst das lange Baculovirusamplifikat erfolgreich mit Hilfe von kompetenten *E. coli*-Zellen in ein Plasmid kloniert. Bei der PCR-Amplifikation zur Kontrolle der Insertion (s. Abbildung 10) ist bei den hohen Konzentrationen ein Abfallen der Fluoreszenz nach Erreichen des Maximums zu erkennen, dieser Effekt wird Hook-Effekt genannt. Der Effekt entsteht bei einer Wiederanlagerung der Einzelstränge, bevor die Sonden binden konnten bzw. wenn bei einem Überangebot an Einzelsträngen nicht mehr ausreichend Sonden vorhanden sind. Der Hook-Effekt beeinflusst die Konzentrationsmessung nicht, da diese bereits in der exponentiellen Phase der Echtzeit-PCR erfolgt ist und auch die Amplifikation bleibt ungestört (Barratt und Mackay, 2002; Stöcher et al., 2003).

Anschließend wurde mit einer Verdünnungsreihe des Plasmids eine Standardkurve erzeugt. Diese Standardkurve (s. Abbildung 11 und Abbildung 12) hat eine Steigung von -3,385, aus der die Reaktionseffizienz abgeleitet wurde. Eine Effizienz von 2,0 bedeutet eine Verdopplung der Anzahl von DNA-Kopien pro Zyklus. Idealerweise sollte eine Effizienz von 1,5 bis 2,2 erreicht werden. Dies entspricht einer Steigung von -5,7 bis -2,9; mit der Steigung von -3,385 wurde dies erreicht. Die Standardkurve hat einen Fehler von 0,166.

Der Fehler stellt die Abweichung zwischen den einzelnen Proben eines Versuches dar, wie etwa Pipetierfehler. Der Regressionskoeffizient von -1,0 dagegen gibt systemische Fehler an, die die gesamte Verdünnungsreihe betreffen. Damit erfüllt die erstellte Standardkurve die formalen Kriterien einer Standardkurve (Rutledge und Côté, 2003; Raymaekers et al., 2009).

In einem anderen Versuch konnte gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,78$ ) in der Extraktions-Effizienz der DNA bei dem automatisierten Verfahren (vgl. 2.2) gibt. Die Baculovirus-DNA wird genauso gut isoliert, wenn sie in den Lysispuffer hinzugegeben wird, wie wenn sie als Probe vorliegt. Somit kann die Einstellung der Baculovirus-Konzentration im Lysispuffer schon vor dem Einsatz als interne Kontrolle genau bestimmt werden. Die Standardabweichung mit 1,2 cp zu 0,7 cp ist etwas größer, wenn das Baculovirus mit dem Lysispuffer zur Probe hinzugegeben wird, dem kleine Verteilungsprobleme innerhalb des automatisierten DNA-Isolationverfahren zu Grunde liegen könnten. Eine Differenz von 0,5 cp ist allerdings bei einer Echtzeit-PCR im Rahmen der normalen Messungenauigkeit und damit vernachlässigbar.

Es musste eine geeignete Konzentration an Baculovirus für die interne Kontrolle gefunden werden, die die Interaktion mit den humanpathogenen Viren minimiert, aber stabil reproduzierbar ist.

Da der Nachweis von HSV und CMV bei einer Baculoviruskonzentration von 10-20 Kopien/Ansatz (ca.  $2 \times 10^3$  Kopien/ml) nicht beeinträchtigt wird und das Baculovirus auch bei der höchsten hier untersuchten Konzentration von  $10^5$  Kopien/ml an humanpathogenen Viren amplifiziert wird, wurde diese Konzentration für die weiteren Versuche an tiefgefrorenen Patientenproben verwendet.

Für den Test der entsprechenden Baculoviruskonzentration im Lysispuffer wurden beispielhaft HSV und CMV verwendet, da sie sich gut in Zellkulturen vermehren und anschließend einfach auf gewünschte Konzentrationen verdünnen lassen. Letztendlich zeigte sich bei den 58 HBV-Patientenproben, dass die HBV-Konzentration in den Patientenproben in der Regel so hoch war, dass das Baculovirus ab einer Konzentration von  $10^6$  Kopien/ml HBV nur noch stochastisch amplifiziert wurde und ab  $10^7$  Kopien/ml HBV inhibiert wurde. Um für das Hepatitis B-Virus eine quantitative Aussage zur Inhibition treffen zu können, müsste eine höhere Baculovirus-Konzentration gefunden werden. Eine Beeinträchtigung des HBV durch das Baculovirus trat nicht auf.

### 4.3 Patientenproben

Für den Versuch mit Patientenproben wurden auf Grund der Vorversuche 10-20 Kopien/Ansatz Baculovirus im Lysis-puffer verwendet. Damit lag die Konzentration in einem Bereich, wie er in Veröffentlichungen ähnlichen Themas beschrieben wurde (Preiser et al, 2003; Hoorfar et al., 2004).

Es ist darauf zu achten, dass die interne Kontrolle der schwächere Partner innerhalb der PCR ist, zum einen, um die PCR-Effizienz der humanpathogenen Viren nicht zu verringern, und zum anderen, um geringe Inhibitionen aufzudecken (Rosenstraus et al., 1998; Hoorfar et al., 2004). Die Konzentration an interner Kontrolle ist von den Eigenschaften der internen Kontrolle und der erwarteten Konzentration an humanpathogenem Virus abhängig. Laut Literatur liegen die Konzentrationen an interner Kontrolle zwischen 20 Kopien/Ansatz (Rosenstraus et al., 1998; Drosten et al., 2000; Hoorfar et al., 2004) und 62500 Kopien/ml (Burggraf et al., 2000). Die niedrigen Konzentrationen wurden tendenziell für Viren und Bakterien verwendet, die wie CMV auch in den Proben nicht in hohen Konzentrationen vorkommen. Für CMV haben Preiser und Kollegen 70 Kopien/Ansatz interne Kontrolle verwendet (Preiser et al., 2003), Rosenstraus verwendete 20 Kopien/Ansatz interne Kontrolle für *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoe* und *Mycobacterium tuberculosis* (Rosenstraus et al., 1998). Im Gegensatz dazu muss für HBV eine höhere Konzentration an interner Kontrolle verwendet werden, z. B. 5000 Kopien/ml Plasmid (Leb et al., 2004). Forschungsgruppen, die eine universelle interne Kontrolle für mehrere DNA-haltigen Viren hergestellt haben, setzen für verschiedene Viren unterschiedliche Konzentrationen ein. So wird für Herpesviren (VZV, HSV 1 und 2) 60-625 Kopien/Ansatz Oligonukleotide verwendet und für HBV 1500 Kopien/Ansatz Oligonukleotide (Burggraf et al., 2004).

Bei der Wahl der niedrigst möglichen Konzentration ergibt sich bei einer kompetitiven internen Kontrolle das Problem, dass hohe Konzentrationen des humanpathogenen Virus die Amplifikation der internen Kontrolle hemmen. Stöcher und Kollegen generierten ein Plasmid als interne Kontrolle für Herpesviren (HSV 1 und 2, CMV, EBV und VZV) (Stöcher et al., 2003). Schon bei 5000 Kopien/ml Herpesviren wurde die interne Kontrolle (500 Kopien/ml) unterdrückt. Courtney und Kollegen beschreiben eine Inhibition der internen Kontrolle (40 Kopien/Ansatz) ab  $4 \times 10^4$  Kopien/Ansatz *Coxiella burnetti* (Courtney et al., 1999).

In den hier durchgeführten Versuchen mit Patientenproben wurde eine Baculovirus-Konzentration von 10-20 Kopien/Ansatz gewählt. Ab einer Konzentration von ca.  $10^6$  Kopien/ml HBV bzw. HSV wird das Baculovirus unterdrückt. Bei den CMV-haltigen Patientenproben lagen die CMV-Konzentrationen so niedrig, dass das Baculovirus nicht inhibiert wurde. Wird die interne Kontrolle durch eine hohe Konzentration von humanpathogenem Virus unterdrückt, so können zusätzliche externe Inhibitionen nicht mehr dokumentiert werden. Dies sollte aber toleriert werden, um die Amplifikation von geringen Konzentrationen humanpathogener Viren nicht zu gefährden.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte im Vergleich von humanpathogenem Virus zu Baculovirus. Waren für beide Viren in der Echtzeit-PCR Fluoreszenzanstiege messbar, so kann davon ausgegangen werden, dass die Amplifikation ohne Störung erfolgte. Ist das Resultat für das humanpathogene Virus hoch-positiv und für das Baculovirus negativ oder unterhalb der erwarteten crossing points, so erfolgte die Amplifikation des humanpathogenen Virus erfolgreich, und das Baculovirus wurde durch das humanpathogene Virus unterdrückt. Ist allerdings für das humanpathogene Virus als auch für das Baculovirus kein Fluoreszenzanstieg messbar, so liegt eine Inhibition vor. Da bereits tiefgefrorene ältere Proben verwendet wurden, bestand auch die Möglichkeit, dass zwar das Baculovirus nachgewiesen wurde, das humanpathogene Virus jedoch nicht. Hier gelang die Amplifikation im allgemeinen, jedoch war das humanpathogene Virus vermutlich durch die Lagerung und den Auftauprozess degeneriert. Bei frischen unbekannten Proben ist bei einem solchen Resultat von einem richtig-negativen Ergebnis auszugehen.

Um geringere Inhibitionen zu messen, die nicht zu einer vollständigen Suppression der internen Kontrolle führen, ist es möglich, andere Inhibitions Grenzen festzulegen. Einige Forschungsgruppen wählten hierfür feste Messbereiche, in denen sich die interne Kontrolle bewegen sollte. Niesters legte einen Bereich von 30-33 crossing points fest (Niesters, 2002). Lag die interne Kontrolle oberhalb der angegebenen Grenze, so ging er von einer Inhibition aus. Die meisten Forschungsgruppen wählten allerdings die zweifache Standardabweichung als Grenze zur Inhibition (van Doornum et al., 2003; Stöcher et al. 2004; Stranska et al., 2004). Sie lag bei Stöcher et al. bei 1,5 cp und bei Stranska bei 1,2 cp. Bei der hier vorgelegten Arbeit lag die Standardabweichung bei 1,2 cp, die doppelte bei 2,4 cp. Dies ergibt bei einem durchschnittlichen Fluoreszenzanstieg des Baculovirus von 35,5 cp über alle humanpathogenen Viren eine Inhibitions Grenze von 37,9 cp. Diese

Inhibitions-grenze liegt direkt an der Nachweisgrenze des Baculovirus und wurde nur stochastisch nachgewiesen. Also wurde die Baculoviruskonzentration so gewählt, dass schon eine geringe Inhibition zur vollständigen Inhibition führt. Da die Standardabweichung mit der Streuung steigt, kann sie auch bei hoher Streuung verwendet werden. Feste Grenzen sind bei einer großen Varianz schlechter als die Verwendung von Standardabweichungen; sie können eine vermeintliche Inhibition anzeigen, bei der nur eine Abweichung durch Streuung vorliegt. Gegen die Verwendung der Standardabweichung für die Inhibitions-grenze des Baculovirus spricht zusätzlich, dass dann eher Inhibitionen angezeigt würden, die durch eine hohe Last an humanpathogenen Viren verursacht werden.

Beim Vergleich zwischen Proben ohne Baculovirus und Proben mit Zugabe von Baculovirus konnte eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse erreicht werden. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson schwankt zwischen 0,94 und 0,99 bei allen drei untersuchten humanpathogenen Viren. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass wie bei anderen Untersuchungen zu diesem Thema die interne Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die Amplifikation der humanpathogenen Viren hat. Betrachtet man sich jedoch die Abbildung 20, Abbildung 22 und Abbildung 24, so erkennt man bei einigen Proben Abweichungen. Hier wurden die crossing points des humanpathogenen Virus mit interner Kontrolle von den crossing points des humanpathogenen Virus ohne interne Kontrolle subtrahiert. Alle Abweichungen um weniger als 1,5 cp werden als normale intra-assay Variationen angesehen. Ist diese Differenz positiv, so wird das humanpathogene Virus mit Baculovirus etwas besser amplifiziert als ohne Baculovirus. Ist die Differenz negativ und kleiner als -1,5 cp, so wird es durch den Zusatz von Baculovirus schlechter amplifiziert. Die Differenzen entstehen z. B. durch kleine Versuchs- und Messungenauigkeiten. Sie werden für die PCR im allgemeinen mit bis zu 30% angegeben (Valentine-Thon, 2002). Von den auf HSV untersuchten Proben wurden drei Proben mit Baculovirus besser amplifiziert. Bei HBV-Proben wurden vier Proben mit Baculovirus besser und drei schlechter amplifiziert. Bei den CMV Untersuchungen wurden acht Proben besser und zwei schlechter amplifiziert. Ähnlich geringe Unterschiede wurden auch von anderen Forschungsgruppen veröffentlicht. Whiley und Kollegen beschreiben, dass die Sensitivität von HSV durch Zugabe von humanem endogenem Retrovirus 3 sinkt (Whiley et al., 2004). Er konnte in vier von 300 Proben nach der Hinzugabe der internen Kontrolle kein HSV nachweisen, ohne Zugabe von interner Kontrolle gelang jedoch der Nachweis. Hodgson und Kollegen fanden bei 272 Proben drei Fälle, die durch Zugabe von interner Kontrolle, in Form eines Plasmid, gestört wurden, so dass keine Amplifikation von HSV

mehr gelang. Allerdings zeigten sich beim selben Versuch drei Fälle, in denen erst durch Zugabe des Plasmids die Amplifizierung gelang (Hodgson et al., 2007). Bei allen sechs beschriebenen Fällen lag die Viruskonzentration an der Nachweisgrenze. Von den gelungenen Amplifikationen veröffentlichten Hodgson und Kollegen 22 Ergebnisse mit Originaldaten. Bei diesen 22 Ergebnissen verbesserten sich die crossing points in sieben Fällen um über 1,5 cp (Differenzen zwischen 1,6-6,0 cp). Auch Sachadyn und Kur stellten sowohl eine Verbesserung als auch eine Verschlechterung der *Agrobacterium*-Amplifikation durch Zugabe von Plasmid als interne Kontrolle fest (Sachadyn und Kur, 1998). Nur in einigen Fällen waren die Verbesserungen reproduzierbar. Da die Autoren einen Thermocycler und Agarosegel verwendeten, kann bei der Verbesserung des Targetnachweises nicht von alleiniger Beeinflussung der Fluoreszenzsignale und der danach erfolgten Konzentrationsberechnung ausgegangen werden, wie sie bei einer Echtzeit-PCR vorkommen kann. Es wird vermutet, dass es bei einer Multiplex-PCR zu weniger Primer-Dimeren kommt (Hodgson et al., 2007). In der hier vorgelegten Arbeit überwiegt ein sehr geringer positiver Effekt auf den Nachweis der humanpathogenen Viren, für HSV sinkt der durchschnittlich gemessene Zyklus um 0,8 cp, für CMV um 0,3 cp und für HBV um 0,1 cp. Insgesamt ist dieser Unterschied aber nicht signifikant.

Auffällig ist die höhere Anzahl an Inhibitionen bei CMV. In diesen Fällen ist auch das hinzugefügte Baculovirus nicht nachweisbar. Bei HSV lag die Inhibition bei ca. 6%, bei HBV bei ca. 4% und bei CMV bei 25%. Da die Inhibition nicht vermehrt in der selben DNA-Extraktion oder der gleichen Echtzeit-PCR auftraten, ist ein Fehler bei dem Versuchsablauf unwahrscheinlich. Sieben der inhibierten Proben wurden in den Läufen der automatischen Extraktionsverfahrens 1 und 2, sechs in den Läufen 7 und 8 und eine Probe in den Läufen 5 und 6 sowie zwei Proben in den Läufen 11 und 12 gefunden. Insgesamt verteilen sich die inhibierten Proben auf sechs PCR-Läufe an unterschiedlichen Tagen. Sowohl in den Extraktionsverfahren als auch in den PCR-Läufen befanden sich Positivkontrollen und weitere Patientenproben, die keine Inhibition zeigten.

14 CMV-Proben, die aus dem Jahre 2008 stammten und 2009 untersucht wurden, zeigten keine Inhibitionen. Diese Proben wurden genutzt um Proben ohne Virusnachweis aus den ersten Versuchen zu ersetzen. Es handelte sich ausschließlich um Serum- oder Plasmaproben, die so ausgewählt wurden, dass sie hohe Virustiter aufwiesen. Den inhibierten Proben ist gemeinsam, dass sie schon ursprünglich eine niedrige Kopienanzahl besaßen. Nur zwei Proben lagen mit 1500 und 3300 Kopien/ml über 600 Kopien/ml. Damit

lag offensichtlich bereits eine Teilinhibition vor, so dass nur der geringe Titer gemessen werden konnten. Durch den Lagerungsprozess wurden die niedrigen Kopienzahlen möglicherweise zerstört. Da das Baculovirus auch in einer Konzentration knapp oberhalb der Nachweisgrenze hinzugefügt wird, wurde es auch vollständig inhibiert.

### 4.4 Ausblick

Durch diese Arbeit, insbesondere die Versuche mit Patientenproben, wurde nachgewiesen, dass sich das Baculovirus als interne Kontrolle eignet. Da die gewählte Konzentration nahe der Nachweisgrenze liegt, ist als Multiplex-PCR nur eine qualitative Aussage zur Inhibition möglich und keine quantitative.

Die hier entwickelte interne Kontrolle bestehend aus Baculovirus wird bereits erfolgreich in der Diagnostik aller am Institut für Virologie getesteten humanpathogenen Viren eingesetzt. Als Teilinhibition wird eine Zyklusdifferenz von mehr als 1,75 Zyklen gewertet. Dies ist eine etwas größere Toleranz als die in dieser Arbeit zu Grunde gelegten 1,5 Zyklen. Die interne Kontrolle wird jedoch nicht als Multiplex-PCR angewendet, sondern als sequenzielle PCR. Es wird zunächst eine quantitative Echtzeit-PCR des Baculovirus durchgeführt. Sollten sich hier keine Inhibitionen zeigen, erfolgt aus dem gleichen Extrakt die PCR zum Nachweis des humanpathogenen Virus.

Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass höhere Konzentrationen an Baculovirus eingesetzt werden können, ohne den Nachweis an humanpathogenen Viren zu beeinträchtigen. Durch die höhere Konzentration an Baculovirus wird die interne Kontrolle nicht durch die humanpathogenen Viren inhibiert. Da sich Teilinhibitionen nun nicht mehr als Vollinhibition darstellen, kann die Teilinhibition quantifiziert werden. Das Ergebnis kann auf das Resultat der humanpathogenen Viren übertragen werden.

Außerdem kann eine anstelle von drei Amplifikatlängen des Baculovirus verwendet werden, da es bei der sequenziellen Amplifikation zu keiner Bevorzugung auf Grund der Amplifikatlänge kommt, wie es bei der Multiplex-PCR geschehen kann. Ein weiterer Vorteil der sequenziellen Testung ist, dass auch Proben in Assays mit Taqman-Sonden analysiert werden können, da es nicht zur Überschneidung der Messkanäle zwischen Hybridisierungs- und TaqMan-Sonden kommen kann.

Nachteilig im Vergleich zur Multiplex-PCR ist ein etwas höherer Arbeitsaufwand, da die PCR zweimalig angesetzt werden muss. Hier besteht auch die Gefahr, dass die Kapazitäten der Echtzeit-PCR-Geräte durch zwei Läufe knapp werden.

Da die Baculovirus-PCR von Anfang an als Multiplex-PCR konzipiert worden war und nur zu den bestehenden Protokollen der humanpathogenen Viren hinzugegeben worden ist, ist eine Optimierung der Baculovirus-PCR ausgeblieben. Da die interne Kontrolle mit dem Baculovirus nun als sequenzielle PCR durchgeführt wird, fand später noch eine Optimierung der gängigen PCR-Parameter statt, wie Magnesiumkonzentration im Mastermix und optimale Annealingtemperatur (Elnifro et al., 2000; Raymaekers et al., 2009).

Zusätzlich zu den in dieser Arbeit untersuchten DNA-Viren wird die interne Kontrolle mit Baculovirus auch für RNA-Viren verwendet. Bevor eine Echtzeit-PCR bei RNA-Viren durchgeführt werden kann, erfolgt nach der Extraktion, die sich nicht von DNA-Viren unterscheidet, eine Reverse Transkription. Bei der Reversen Transkription wird mit Hilfe von Reverser Transkriptase eine doppelsträngige, sogenannte *complementary DNA* (cDNA) für die Echtzeit-PCR hergestellt. Die Reverse Transkriptase ist für RNasen sehr anfällig, so dass die Reverse Transkription beim Nachweis von RNA-Viren ein fehleranfälliger Schritt ist, bei dem leicht Inhibitionen entstehen. Durch Verwendung eines DNA-haltigen Virus, wie dem Baculovirus, kann dieser Schritt nicht kontrolliert werden. Hierzu müsste man ein anderes insekten- oder tierpathogenes RNA-Virus verwenden. Niesters konnte am Seehundstaupe-Virus zeigen, dass dies möglich ist (Niesters, 2002). Am häufigsten für die interne Kontrolle RNA-haltiger Viren, werden Plasmide verwendet (Zimmermann und Mannhalter, 1996; Damen et al., 2008; Stals et al., 2009). Auch hier kann die Reverse Transkription nicht überwacht werden.

Da RNA-Viren sehr instabil und anfällig für RNasen sind, wird die Möglichkeit genutzt, einen RNA-Abschnitt in Bakteriophagen-Hüllproteine einzubetten, die sog. Pseudovirus-Partikeln. So sind sie vor RNasen geschützt und länger lagerungsfähig. Solche Pseudovirus-Partikel wurden für das West-Nile-Virus (Eisler et al., 2004) und das Hepatitis C-Virus erfolgreich hergestellt (Villanova et al., 2006). Bei Pseudovirus-Partikeln, die denselben RNA-Abschnitt enthalten, wie das humanpathogene Virus besteht die Gefahr der Kontamination bei der Herstellung sowie falsch-positive Resultate durch Nachweis der Pseudovirus-Partikel.



## 5 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Titel: Entwicklung und Implementierung einer internen Kontrolle für die PCR-Diagnostik humanpathogener Viren

eingereicht von Kathrin Stein, geb. Ohse

angefertigt am Institut für Virologie der Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Gerd Liebert  
Melanie Maier

Die Polymerase Kettenreaktion hat der Diagnostik von Viren zu neuen Möglichkeiten verholfen, und Ergebnisse können im Gegensatz zur vorher üblichen Zellkultur innerhalb eines Arbeitstages erzielt werden. Da sowohl die DNA-Extraktion als auch die PCR störanfällige Verfahren sind, bedarf es externer und interner Kontrollen zur Überwachung dieser Verfahren. Externe Kontrollen, so genannt, da sie der Probe nicht direkt zugesetzt werden, weisen als Negativkontrolle Kontaminationen nach, und als Positivkontrolle beweisen sie die technisch einwandfreie Ausführung der PCR. Interne Kontrollen werden jeder Probe zugegeben. Sie ermöglichen, die PCR-Reaktion in jedem einzelnen

Reaktionsgefäß bzw. in jeder Probe zu kontrollieren. Hiermit können teilweise oder vollständige Inhibitionen der enzymatischen Reaktion und die Effizienz der Nukleinsäureextraktion nachgewiesen werden. Wird eine Inhibition detektiert, kann häufig durch eine anschließende Untersuchung eines anderen Aliquots oder erneute Testung nach Verdünnung ein verlässliches Ergebnis erzielt werden. Dadurch steigt die Sensivität der PCR ohne Beeinflussung der Spezifität.

In der Virologie haben sich als interne Kontrollen insbesondere Plasmide und artfremde Viren etabliert, *housekeeping* Gene spielen nur eine untergeordnete Rolle. Plasmide haben den Vorteil, dass sie einfach herzustellen sind und bei entsprechender Konstruktion auch für mehrere Virusarten zu verwenden sind. Sie können aber die DNA-Extraktion nicht vollständig kontrollieren. Artfremde Viren können sowohl die PCR verschiedener Viren als auch die vorgeschaltete DNA-Extraktion überwachen.

Ziel der hier vorgelegten Dissertation war die Entwicklung und Implementierung einer internen Kontrolle auf Basis eines nicht humanpathogenen Virus. Die interne Kontrolle soll sich im Institut für Virologie zuverlässig für die PCR aller DNA-haltiger Viren anwenden lassen. Zur Zeitersparnis soll es möglich sein, die interne Kontrolle während der DNA-Extraktion automatisch zu den Proben hinzuzufügen, und sie soll eine möglichst hohe Stabilität aufweisen. Des Weiteren soll der Nachweis der internen Kontrolle zur Zeitersparnis als Multiplex-PCR zusammen mit dem humanpathogenen Virus durchgeführt werden.

Ausgesucht wurde für die interne Kontrolle *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* aus der Gruppe der Baculoviren. Dieses Virus besitzt eine doppelsträngige DNA mit ca. 130 kb; es ist in der Literatur gut beschrieben und lässt sich zuverlässig anzüchten. Der als interne Kontrolle verwendete Genomabschnitt wurde so ausgesucht, dass eine hohe Übereinstimmung in Amplifikatlänge, Guanin-Cytosin-Gehalt und Schmelztemperatur zu den humanpathogenen Amplifikaten vorliegt. Da die Amplifikatlänge der zu kontrollierenden humanpathogenen Viren variiert, wurden drei verschiedene Amplifikatlängen der Baculovirus-DNA konstruiert, wofür drei unterschiedliche Antisense-Primer identifiziert und hergestellt wurden. Auch bei der Auswahl der Sonden und Primer für das Baculovirus wurde eine möglichst hohe Ähnlichkeit zu den Primern und Sonden der humanpathogenen Viren angestrebt. Hier musste eine Bindung der Baculovirus-Primer und -Sonden an die humanpathogenen Viren

und an das humane Genom weitgehend ausgeschlossen werden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Zunächst konnte in Vorversuchen mit virusnegativen Proben verschiedenen humanem Ursprungs (Serum, Lymphozyten, Urin, bronchoalveoläre Lavage und Pleurapunktat) gezeigt werden, dass die Bindungseigenschaften der spezifischen Primer und Sonden des Baculovirus eine Amplifikation des humanen Genoms minimieren. Dies konnte auch für die Zellkulturüberstände der humanpathogenen Viren Herpes simplex, Cytomegalievirus und Hepatitis B-Virus, die jeweils eine Amplifikatlänge (kurz, mittel, lang) vertraten, nachgewiesen werden.

Außerdem wurde in Lagerungsversuchen nachgewiesen, dass Baculovirus vermischt mit Lysispuffer der Nukleinsäure-Extraktion (MagNA Pure) über mindestens eine Woche bei 4°C aufbewahrt werden kann, ohne dass es zu einem relevanten Verlust an DNA kommt, die Differenz betrug maximal 1 cp. Dies bringt eine Reduktion der Arbeitsbelastung, da ein tägliches Ansetzen nicht notwendig ist.

An Zellkulturüberständen des Herpes simplex-Virus und des Cytomegalievirus wurde die Baculovirus-Konzentration bestimmt, die in der PCR stabil amplifiziert werden kann, aber gleichzeitig geringe Mengen an humanpathogenen Viren nicht inhibiert. Die bestimmte Konzentration an Baculovirus liegt bei 10-20 Kopien/Ansatz und befindet sich damit im Bereich der 95%-Nachweisgrenze von 5 Kopien/Ansatz. Eine geringe Inhibition führt somit zur vollständigen Unterdrückung der Baculovirus-PCR; somit wird eine Inhibition auch ohne die Berechnung der Abweichung sofort sichtbar. In der Literatur wird zumeist von einer teilweisen Inhibition gesprochen, wenn die Differenz der *crossing points* die zweifache Standardabweichung überschreitet. Wendet man die zweifache Standardabweichung auf die hier entwickelte PCR an, so liegt bereits eine vollständige Inhibition vor.

Auch bei hohen Konzentrationen an humanpathogenen Viren wurde die Baculovirus-PCR erwartungsgemäß inhibiert, dies kam insbesondere bei Hepatitis B-Virus und Herpes simplex-Virus vor. Hier wurde die Unterdrückung des Baculovirus durch die Konkurrenzsituation innerhalb der Multiplex-PCR verursacht. Eine Teilinhibition durch andere Ursachen ist in einer solchen Situation nicht mehr zu bestimmen.

Die entwickelte interne Kontrolle wurde an 189 Patientenproben überprüft, die in der Routinediagnostik bereits positiv auf die entsprechenden Viren getestet worden waren. Die Proben waren bei -20°C gelagert worden. Um vergleichen zu können, ob die PCR-

Reaktion das humanpathogenen Virus nicht beeinträchtigt, wurde die PCR mit und ohne Baculovirus durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die Zugabe des Baculovirus erfolgte während der automatischen DNA-Extraktion, es war dem Lysispuffer beigemischt.

Die Ergebnisse der Patientenproben zeigen, dass eine Inhibition der PCR bei 6,9% der HBV-Proben, 5,8% der HSV-Proben und 25,4% der CMV-Proben vorlag. Während die ersten beiden Ergebnisse mit Literaturangaben übereinstimmen, ist die Inhibition bei CMV hoch. Hier lagen sowohl die CMV-Konzentrationen als auch die Baculovirus-Konzentrationen am Rande der Nachweisgrenze, so dass vermutlich geringe Störungen eher sichtbar wurden.

Mit den Analysen der Patientenproben war es möglich zu zeigen, dass die interne Kontrolle in der Multiplex-PCR keinen negativen Einfluss auf den Nachweis der humanpathogenen Viren hat. Beim HBV weichen die mittleren crossing points (cp) um 0,2 cp von einander ab, mit einem 95%-Konfidenzintervall -0,2-0,6 cp. Für HSV lag die mittlere Abweichung bei 0,3 cp mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,2-0,5 cp. CMV zeigt eine Abweichung der mittleren crossing points von 0,3 cp bei einem 95%-Konfidenzintervall 0,1-0,7 cp. Diese Unterschiede sind bei einer diagnostischen quantitativen PCR vernachlässigbar. Führt man eine Korrelationsanalyse durch, so liegen die Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen 0,942 und 0,996 mit einem p-Wert < 0,01.

Die mit dieser Arbeit vorgestellte interne Kontrolle auf Basis des Baculovirus wird mittlerweile in der Routinediagnostik des Instituts für Virologie erfolgreich verwendet. Sie wird allerdings nicht, wie ursprünglich geplant, als Multiplex-PCR angewandt, sondern als sequenzielle PCR. Dies bringt den Vorteil, dass die Baculovirus-Konzentration höher gewählt werden kann, ohne dass es zu Beeinträchtigung des humanpathogenen Virus kommt. Hierdurch wird die PCR des Baculovirus noch zuverlässiger, da sie nicht an der Nachweisgrenze durchgeführt wird und eine Inhibition des Baculovirus durch hohe Mengen an humanpathogenen Viren nicht mehr möglich ist. Des Weiteren können Teilinhibitionen abgeschätzt werden, da die zugegebene Menge an Baculovirus bekannt ist. Nach Quantifizierung der Teilinhibition in der Baculovirus-PCR lässt sich das Ergebnis auf das Resultat der humanpathogenen Viren übertragen. Von Vorteil ist die gleich bleibend hohe analytische Sensitivität der diagnostischen quantitativen PCR. Nachteilig bei der sequenziellen PCR ist ein erhöhter Arbeitsaufwand.

Außerdem wird die interne Kontrolle bei RNA-Viren verwendet. Hierfür wäre es für die Zukunft denkbar eine eigenständige interne Kontrolle zu konstruieren, die auf RNA-Viren basiert. Der Vorteil hiervon ist, dass auch die störanfällige Transkription durch Reverse Transkriptase überwacht werden kann.

## 6 Literaturverzeichnis

**Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P (2000):** Identification and Characterization of Immunoglobulin G in Blood as a Major Inhibitor of Diagnostic PCR  
J. Clin. Microbiol. 38: 345-350

**Al-Soud WA, Rådström P (2001):** Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells  
J. Clin. Microbiol. 39(2): 485-493

**Arif BM (2005):** A brief journey with insect viruses with emphasis on baculoviruses  
J. Intervent. Pathol. 89: 39-45

**Bai X, Rogers BB, Harkins PC, Sommerauer J, Squires R, Rotondo K, Quan A, Dawson DB, Scheuermann RH (2000):** Predictive value of quantitative PCR-based viral burden analysis for eight human herpesviruses in pediatric solid organ transplant patients  
J. Mol. Diagn. 2(4): 191-201

**Barratt K, Mackay JF (2002):** Improving real-time PCR genotyping assays by asymmetric amplification  
J. Clin. Microbiol. 40(4): 1571-1572

**Boeckh M, Boivin G (1998):** Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications  
Clin. Microbiol. Rev. 11: 533-554

**Burggraf S, Olgemöller B (2004):** Simple technique for internal control of real-time amplification assays  
Clin. Chem. 50(5): 819-825

**Bezold G, Volkenandt M, Gottlöber P, Peter RU (2000):** Detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus in clinical swabs: frequent inhibition of PCR as determined by internal controls  
Mol. Diagn. 5(4): 279-284

**Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005):** Quantitative real-time RT-PCR – a perspective  
J. Mol. Endocrinol. 34(3): 597-601

**Chakrabarti S, Brechling K, Moss B (1985):** Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques  
Mol Cell Biol. 5(12): 3403–3409

**Cone RW, Hobson AC, Huang ML (1992):** Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions  
J. Clin. Microbiol. 30(12): 3185-3189

**Courtney BC, Smith MM, Henchal EA (1999):** Development of internal controls for probe-based nucleic acid diagnostic assays  
Anal. Biochem. 270: 249-256

- Damen M, Minnaar R, Glasius P, van der Ham A, Koen G, Wertheim P, Beld M (2008):** Real-Time PCR with an internal control for detection of all known human adenovirus serotypes  
J. Clin. Microbiol. 46(12): 3997-4003
- Deggerdal A, Larsen F (1997):** Rapid isolation of PCR-ready DNA from blood, bone marrow and cultured cells, based on paramagnetic beads  
Biotechniques 22(3): 554-557
- DiDomenico N, Link H, Knobel R, Caratsch T, Weschler W, Loewy ZG, Rosenstraus M (1996):** COBAS AMPLICOR: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR  
Clin. Chem. 42(12): 1915-1923
- Drosten C, Weber M, Seifried E, Roth WK (2000):** Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening  
Transfusion 40(6): 718-724
- Du Prel JP, Hommel G, Röhring B, Blettner M (2009):** Konfidenzintervall oder p-Wert?  
Dtsch. Arztebl. 106(19): 335-339
- Eisler DL, McNabb A, Jorgensen DR, Isaac-Renton JL (2004):** Use of an internal positive control in a multiplex reverse transcription-PCR to detect West Nile virus RNA in mosquito pools  
J. Clin. Microbiol. 42(2): 841-843
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE (2000):** Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology  
Clin. Microbiol. Rev. 13(4): 559-570
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF (2006):** Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing  
Clin. Microbiol. Rev. 19(1): 165-256
- Friesen PD, Miller LK (2001):** Insect Viruses in Fields Virology, Fourth Edition, Editors Knipe DM, Howley PM, Chapter 20: 599-628
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996):** Real time quantitative PCR  
Genome Res. 6(10): 986-994
- Herniou EA, Luque T, Chen X, Vlack JM, Winstanley D, Cory JS, O'Reilly DR (2001):** Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny  
J. Virol. 75 (17): 8117-8126
- Hodgson J, Zuckerman M, Smith M (2007):** Development of a novel internal control for a real-time PCR for HSV DNA types 1 and 2  
J. Clin. Virol. 38: 217-220

- Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P (2004):** Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays  
J. Clin. Microbiol. 42(5): 1863-1868
- Janakiraman V, Forrest WF, Chow B, Seshagiri S (2006):** A rapid method for estimation of baculovirus titer based on viable cell size  
J. Virol. Methods 132(1-2): 48-58
- Jothikumar P, Hill V, Narayanan J (2009):** Design of FRET-TaqMan probes for multiplex real-time PCR using an internal positive control  
Biotechniques 46(7) 519-524
- Kessler HH, Mühlbauer G, Stelzl E, Daghofer E, Santner BI, Marth E (2001):** Fully automated nucleic acid Extraction: MagNA Pure LC  
Clin. Chem. 47(6):1124-1126
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971):** Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases  
J. Mol. Biol. 56(2): 341-361
- Klöcker U, Oberwinkler H, Kürschner T, Protzer U (2003):** Presence of replicating virus in recombinant hepadnavirus stocks results from recombination and can be eliminated by the use of a packaging cell line  
J. Virol. 77(5): 2873-2881
- Leb V, Stöcher M, Valentine-Thon E, Hölzl G, Kessler H, Stekel H, Berg J (2004):** Fully automated, internally controlled quantification of hepatitis B Virus DNA by real-time PCR by use of the MagNA Pure LC and LightCycler Instruments  
J. Clin. Microbiol. 42(2): 585-590
- Löffler M (Herausgeber) (2004):** Methodensammlung zur Auswertung klinischer und epidemiologischer Daten, Leipzig, 2004
- Long F, Zhu XN, Zhang ZM, Shi XM (2008):** Development of a quantitative polymerase chain reaction method using a live bacterium as internal control for the detection of *Listeria monocytogenes*  
Diagn. Microbiol Infect. Dis. 62: 374-381
- Lu A, Carstens EB (1991):** Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus  
Virology 181: 336-347
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002):** Real-time PCR in virology  
Nucleic Acids Res. 30 (6): 1292-1305
- Mackay IM (2004):** Real-time PCR in the microbiology laboratory  
Clin. Microbiol. Infect. 10(3): 190-212



- Maaroufi Y, de Bruyne JM, Duchateau V, Scheen R, Crokaert F (2006):** Development of a multiple internal control for clinical diagnostic real-time amplification assays  
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 48(2): 183-191
- McCulloch RK, Choong CS, Hurley DM (1995):** An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR  
PCR Methods Appl. 4(4): 219-226
- Murphy CI, Piwnica-Worms H, Grünwald S, Romanow WG, Francis N, Fan HY (2004):** Overview of the Baculovirus Expression System  
Current Protocols in Molecular Biology, Section II, Unit 16.9
- Niesters HG (2002):** Clinical virology in real time  
J.Clin. Virol. 25(Suppl. 3):3-12
- Niesters HG (2004):** Molecular and diagnostic clinical virology in real time  
Clin. Microbiol. Infect 10(1): 5-11
- Okano K, Vanarsdall AL, Mikhailov VS, Rohrmann GF (2006):** Conserved molecular systems of the Baculoviridae  
Virology 344(1): 77-87
- Peng K, van Oers MM, Hu Z, van Lent JWM, Vlak JM (2010):** Baculovirus per os infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus  
J. Virol. 84(18): 9497-9504
- Petrich, A., J. Mahony, S. Chong, G. Broukhanski, F. Gharabaghi, G. Johnson, L. Louie, K. Luinstra, B. Willey, P. Akhavan, L. Chui, F. Jamieson, M. Louie, T. Mazzulli, R. Tellier, M. Smieja, W. Cai, M. Chernesky, S. E. Richardson, and the Ontario Laboratory Working Group for the Rapid Diagnosis of Emerging Infections. (2006).** Multicenter comparison of nucleic acid extraction methods for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA in stool specimens.  
J. Clin. Microbiol. 44: 2681-2688
- Pham DG, Madico GE, Quinn TC,ENZLER MJ, Smith TF, Gaydos CA (1998):** Use of lambda phage DNA as a hybrid internal control in a PCR-enzyme immunoassay to detect *Chlamydia pneumoniae*  
J. Clin. Microbiol. 36(7): 1919-1922
- Picard FJ, Gagnon M, Bernier MR, Parham NJ, Bastien M, Boissinot M, Peytavi R, Bergeron MG (2009):** Internal control for nucleic acid testing based on the use of purified *Bacillus atrophaeus* subsp. *globigii* spores  
J. Clin. Microbiol. 47(3): 751-757
- Preiser W, Brink NS, Ayliffe U, Peggs KS, Mackinnon S, Tedder RS, Garson JA (2003):** Development and clinical application of a fully controlled quantitative PCR assay for cell-free cytomegalovirus in human plasma  
J. Clin. Virol. 26(1): 49-59

- Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R (2009):** Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays  
J. Clin. Lab. Anal. 23(3): 145-151
- Reiss RA, Rutz B (1999):** Quality control PCR: a method for detecting inhibitors of Taq DNA polymerase  
Biotechniques 27(5): 920-926
- Revello MG, Baldanti F, A Sarasini A, Zavattoni M, Torsellini M, Gerna G (1997):** Prenatal Diagnosis of Rubella Virus Infection by Direct Detection and Semiquantitation of Viral RNA in Clinical Samples by Reverse Transcription-PCR  
J. Clin. Microbiol., 35(3): 708-713
- Rosenstrauss M, Wang Z, Chang SY, DeBonville D, Spadaro JP (1998):** An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance  
J. Clin. Microbiol. 36 (1): 191-197
- Rosinsky M, Reid S, Nielsen LK (2002):** Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction  
Biotechnol. Bioeng. 77 (4):476-480
- Rutledge RG, Côté C (2003):** Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves  
Nucleic Acids Res. 31(16): e93
- Sachadyn P, Kur J (1998):** The construction and use of a PCR internal control  
Mol. Cell. Probes 12(5): 259-262
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985):** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia  
Science 230(4732): 1350–1354
- Satsangi J, Jewell DP, Welsh K, Bunce M, Bell JI (1994):** Effect of heparin on polymerase chain reaction  
Lancet 343(8911): 1509-1510
- Schneider A, Hommel G, Blettner M (2010):** Linear regression analysis  
Dtsch Arztebl Int 107(44): 776-782
- Shuman S (1991):** Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific  
Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 10104-10108
- Schnorr, JJ (1989):** Expression von Masernvirusproteinen im Baculosystem  
Diplomarbeit an der Julius-Maximillan-Universität, Würzburg

- Stals A, Baert L, Botteldoorn N, Werbrouk H, Herman L, Uyttendaele M, Van Coillie E (2009):** Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1  
J. Virol. Methods 161(2): 247-253
- Stöcher M, Berg J (2002):** Normalized quantification of human cytomegalovirus DNA by competitive real-time PCR on LightCycler instrument  
J. Clin. Microbiol. 40(12): 4547-4553
- Stöcher M, Leb V, Hölzl G, Berg J (2002):** A simple approach to the generation of heterologous competitive internal controls for real-time PCR assays on the LightCycler  
J. Clin. Virol. 25 (Suppl. 3): 47-53
- Stöcher M, Leb V, Berg J (2003):** A convenient approach to the generation of multiple internal control DNA for a panel of real-time PCR assay  
J. Virol. Methods 108(1): 1-8
- Stöcher M, Hölzl G, Stekel H, Berg J (2004):** Automated detection of five human herpes virus DNAs by a set of LightCycler PCRs complemented with a single multiple internal control  
J. Clin. Virol. 29(3): 171-178
- Stránská R, Schuurman R, de Vos M, van Loon AM (2004):** Routine use of a highly automated and internally controlled real-time PCR assay for the diagnosis of herpes simplex and varicella-zoster infections  
J. Clin. Virol. 30(1): 39-44
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999):** Housekeeping genes as internal standards: use and limits  
J. Biotechnol. 75: 291-295
- Valentine-Thon E (2002):** Quality control in nucleic acid testing – where do we stand?  
J. Clin. Virol. 25(Suppl. 3): 13-21
- van Doornum GJ, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG (2003):** Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture  
J. Clin. Microbiol. 41(2): 576-580
- Villanova GV, Gardiol D, Taborda MA, Reggiardo V, Tanno H, Rivadeneira ED, Perez GR, Giri AA (2007):** Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR  
J. Clin. Microbiol. 45(11): 3555-3563
- von Ahsen N, Oellerich M, Schütz E (2000):** Use of two reporter dyes without interference in a single-tube rapid-cycle PCR: alpha(1)-antitrypsin genotyping by multiplex real-time fluorescence PCR with the LightCycler  
Clin. Chem. 46(2):156-161

**Whiley DM, Mackay IM, Syrmis MW, Witt MJ, Sloots TP (2004):** Detection and differentiation of herpes simplex types 1 and 2 by a duplex LightCycler PCR that incorporates an internal control PCR reaction  
J. Clin. Virol. 30(1):32-38

**Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997):** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification  
Biotechniques 22(1): 130-138

**Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ (1997):** The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control  
Biotechniques 22(1): 176-181

**Yedidag EN, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis M (1996):** Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus  
Transplantation 62(2): 238-242

**Zimmermann K, Mannhalter JW (1996):** Technical aspects of quantitative competitive PCR  
Biotechniques 21(2): 268-279

Instruction Manual von Topo TA Cloning, Invitrogen, Version Q, 2003

Gebrauchsanleitung NucleoSpin Blood-Kit, 2006

Roche LightCycler Manual 3.5

Roche Molecular Biochemicals, Technical Note No. LC 8/99: [https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/lightcycler\\_docs/technical\\_notes/lc\\_08.pdf](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/lightcycler_docs/technical_notes/lc_08.pdf), vom 16.11.09

User Manual von NanoDrop

Handbook QIAprep Miniprep von Qiagen; 2004

MagnaPure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit Gebrauchsanleitung; Version Juli 2005

[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/appendix/PCR\\_RTPCR/Important%20Parameters%20of%20qPCR.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/appendix/PCR_RTPCR/Important%20Parameters%20of%20qPCR.pdf) vom 06.02.09

## 7 Anhang

### 7.1 Übersicht über die Eigenschaften der Viren

In den nachfolgenden drei Tabellen sind die wichtigen Kenngrößen der humanpathogenen Viren dargestellt. Sie wurden verwendet, um die Baculovirus-Primer und -Sonden abzugleichen und die entsprechenden Amplifikate zu suchen. Die Eigenschaften der Primer und Sonden, sowie der Amplifikate sollten sich gleichen, damit die PCR-Effizienz möglichst ähnlich. Das ist wichtig, um zum einen einer Bevorzugung vorzubeugen und zum anderen das Ausmaß einer eventuellen Inhibition abschätzen zu können.

	HSV	PVB 19	VZV
Primer	HSV-L For / HSV-L Rev	PVB 2 / PVB 6	VZV 28-L For / VZV 28-L Rev
Primerlänge	22 bp / 17 bp	28 bp / 24 bp	25 bp / 23 bp
GC-Gehalt Primer	50% / 76%	25% / 46%	32% / 39%
Primer Schmelzpunkt	55°C / 57°C	55°C / 60°C	51,1°C / 51,7°C
Sonden	HSV-L FL / HSV-L LC	PVB-L FL / PVB-L LC	VZV28-L 3FL / VZV28-L 5LC
Sondenlänge	28 bp / 21 bp	25 bp / 26 bp	25 bp / 25 bp
GC-Gehalt Sonden	64,3% / 71,4%	48% / 54%	40% / 44%
Sonden Schmelzpunkt	76,1°C / 71°C	74°C / 80°C	60,7°C / 58,4°C
Amplifikatlänge	215 bp	185 bp	228 bp
Gen	Polymerase UL30	NS 1	DNA-Polymerase
GC-Gehalt Amplifikat	62%	42%	46%
Temperatur basic	88°C	82°C	82°C
Temperatur salt adjusted	102°C	95°C	95°C

**Tabelle 7      Eigenschaften der Viren mit kleiner Amplifikatlänge**

Zu sehen sind die für die PCR notwendigen Eigenschaften der Viren kleiner Amplifikatlänge.

	CMV	HHV 6	EBV
Primer	CMV 1 / CMV 2	HHV 6 (1) / HHV 6 (2)	EBV LO / EBV UP
Primerlänge	25 bp / 25bp	22 bp / 22 bp	19 bp / 20 bp
GC-Gehalt Primer	60% / 64%	40,9% / 59,1%	74% / 55%
Primer Schmelzpunkt	67,9°C / 69,5°C	64°C / 64°C	69°C / 54°C
Sonden	CMV FL / CMV LC	HHV-6 FL / HHV-6 LC	EB-FL / EB-LC
Sondenlänge	30 bp / 27 bp	30 bp / 29 bp	26 bp / 26 bp
GC-Gehalt Sonden	60% / 63%	33% / 45%	65% / 61%
Sonden Schmelzpunkt	72,8°C / 70,8°C	63,4°C / 65,8°C	72,1°C / 71,7°C
Amplifikatlänge	434 bp	332 bp	354 bp
Gen	Immediat early transcriptional regulator 1	Glykoprotein B	BLRF 2
GC-Gehalt Amplifikat	55%	44%	54%
Temperatur basic	86°C	81°C	85°C
Temperatur salt adjusted	100°C	95°C	99°C

**Tabelle 8 Eigenschaft der Viren mit mittlerer Amplifikatlänge**

Abgebildet sind die für die PCR essentiellen Eigenschaften der Viren mittlerer Amplifikatlänge.

	HBV
Primer	M01 / M02c2
Primerlänge	19 bp / 25 bp
GC-Gehalt Primer	52,6% / 36%
Primer Schmelzpunkt	67,9°C / 69,5°C
Sonden	HBV mOLK / HBV mOF
Sondenlänge	26 bp / 25 bp
GC-Gehalt Sonden	50% / 48%
Sonden Schmelzpunkt	65,2°C / 64,8°C
Amplifikatlänge	510 bp
Gen	mHBs
GC-Gehalt Amplifikat	49%
Temperatur basic	83,6°C
Temperatur salt adjusted	97,4°C

**Tabelle 9 Eigenschaften des Virus mit langer Amplifikatlänge**

In die lange Amplifikatlänge wurde nur das HBV eingruppiert, hier sind seine PCR-wichtigen Kenngrößen zu entnehmen.

## 7.2 Mastermixe und Lightcycler Protokolle

Alle Primer wurden von Metabion®, Martinsried bezogen. Die Sonden wurden alle von TIB Molbiol, Berlin bezogen. Schmelzpunkte wurden nach thermodynamischer Berechnung ermittelt.

PH = Phosphat, 640 = LC Red 640, 705 = LC Red 705, FL = Fluorescein

Aqua ad iniectiblia 10ml	Braun
10-fach PCR Rxn Buffer	Invitrogen
50mM Magnesiumchlorid	Invitrogen
dNTP-Lösung (10 mM each dNTP)	Roche, Fermentas
BSA 2mg/ml	Sigma
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen
SYBR Green II	Invitrogen, Molecular Probes
DMSO 100%	Sigma

### 7.2.1 Baculovirus mit Sonden

Mastermix für einen Ansatz: Aqua ad iniectiblia	6,0µl ad 15µl
BSA 2mg/ml	0,5µl
Nucleotide 10mM	0,5µl
Magnesiumchlorid 50mM	1,6µl
10-fach PCR Puffer	2,0µl
Primer Baculovirus 8.1s 10mM	1,0µl
Primer Baculovirus 8.x@s 10mM	1,0µl
Sonde Baculovirus FL 1pmol	1,0µl
Sonde Baculovirus 705 1pmol	1,0µl
Taq Polymerase	0,4µl
	= 15,0µl Mastermix
	+5,0µl isolierte DNA
	= 20,0µl Ansatz

x = 1 mit einer Amplifikatlänge von 211bp, 2 mit einer Länge von 393bp und 3 mit 505bp

Programm für den LightCycler:

1. Denaturierung: 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	95°C	40sec	20°C/sec

2. Amplifikation : 45 Zyklen

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	57°C	10sec	20°C/sec single
3.	72°C	22sec	20°C/sec

3. Schmelzen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	30sec	20°C/sec
2.	34°C	32sec	20°C/sec
3.	85°C	0sec	0,1°C/sec continous

4. Kühlen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	40°C	60sec	20°C/sec

Messung im Kanal F3/



### 7.2.2 HBV

Mastermix für einen Ansatz:	Aqua ad iniectiblia	6,0µl ad 15,0µl
	BSA 2mg/ml	0,5µl
	Nucleotide 10mM	0,5µl
	Magnesiumchlorid 50mM	1,6µl
	10-fach PCR Puffer	2,0µl
	Primer HBV m01 10µM	1,0µl
	Primer HBV m02c2 10µM	1,0µl
	Sonde HBV mOLK 3pM	1,0µl
	Sonde HBV mOF 3pM	1,0µl
	Taq Polymerase	0,4µl
		= 15,0µl Mastermix
		+5,0µl isolierte DNA
		= 20,0µl Ansatz

Programm für den LightCycler:

#### 1. Denaturierung: 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	95°C	40sec	20°C/sec

#### 2. Amplifikation : 45 Zyklen

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	57°C	10sec	20°C/sec single
3.	72°C	22sec	20°C/sec

#### 3. Schmelzen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	30sec	20°C/sec
2.	34°C	32sec	20°C/sec
3.	85°C	0sec	0,1°C/sec continous

#### 4. Kühlen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	40°C	60sec	20°C/sec

Messung im Kanal F2/F1

### 7.2.3 HBV mit Baculovirus

Mastermix für einen Ansatz:	Aqua ad iniectionem	2,0µl ad 15,0µl
	BSA 2mg/ml	0,5µl
	Nucleotide 10mM	0,5µl
	Magnesiumchlorid 50mM	1,6µl
	10-fach PCR Puffer	2,0µl
	Primer HBV m01 10µM	1,0µl
	Primer HBV m02c2 10µM	1,0µl
	Sonde HBV mOLK 3pM	1,0µl
	Sonde HBV mOF 3pM	1,0µl
	Primer Baculovirus 8.1s 10µM	1,0µl
	Primer Baculovirus 8.3@s 10µM	1,0µl
	Sonde Baculovirus FL 1pM	1,0µl
	Sonde Baculovirus 705 1pM	1,0µl
	Taq Polymerase	0,4µl
		= 15,0µl Mastermix
		+5,0µl isolierte DNA
		= 20,0µl Ansatz

Programm für den LightCycler:

1. Denaturierung: 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	95°C	40sec	20°C/sec

2. Amplifikation : 45 Zyklen

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	57°C	10sec	20°C/sec single
3.	72°C	22sec	20°C/sec

3. Schmelzen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	30sec	20°C/sec
2.	34°C	32sec	20°C/sec
3.	85°C	0sec	0,1°C/sec continuous

4. Kühlen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	40°C	60sec	20°C/sec

Messung des HBV im Kanal F2/F1 und des Baculovirus im Kanal F3/F1

### 7.2.4 HSV

Mastermix für einen Ansatz:	Aqua ad iniectiblia	5,4µl ad 15,0µl
	BSA 2mg/ml	1,0µl
	Nucleotide 10mM	0,5µl
	Magnesiumchlorid 50mM	1,6µl
	10-fach PCR Puffer	2,0µl
	DMSO 100% (Sigma)	0,3µl
	Primer HSV-L for 10µM	1,0µl
	Primer HSV-L rev 10µM	1,0µl
	Sonde HSV-L FL 3pM	1,0µl
	Sonde HSV-L LC 3pM	1,0µl
	Taq Polymerase	0,2µl
		= 15,0µl Mastermix
		+5,0µl isolierte DNA
		= 20,0µl Ansatz

Programm für den LightCycler:

#### 1. Denaturierung: 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	95°C	30sec	20°C/sec

#### 2. Amplifikation : 45 Zyklen

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	58°C	10sec	20°C/sec single
3.	72°C	20sec	20°C/sec

#### 3. Schmelzen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	50°C	40sec	20°C/sec
3.	85°C	0sec	0,2°C/sec continous

#### 4. Kühlen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	40°C	60sec	20°C/sec

Messung im Kanal F2/F1

### 7.2.5 HSV mit Baculovirus

Mastermix für einen Ansatz:	Aqua ad iniectionem	1,4µl ad 15,0µl
	BSA 2mg/ml	1,0µl
	Nucleotide 10mM	0,5µl
	Magnesiumchlorid 50mM	1,6µl
	10-fach PCR Puffer	2,0µl
	DMSO 100%	0,3µl
	Primer HSV-L for 10µM	1,0µl
	Primer HSV-L rev 10µM	1,0µl
	Sonde HSV-L FL 3pM	1,0µl
	Sonde HSV-L LC 3pM	1,0µl
	Primer Baculovirus 8.1s 10µM	1,0µl
	Primer Baculovirus 8.1@s 10µM	1,0µl
	Sonde Baculovirus FL 1pmol	1,0µl
	Sonde Baculovirus 705 1pmol	1,0µl
	Taq Polymerase	0,2µl
		= 15,0µl Mastermix
		+5,0µl isolierte DNA
		= 20,0µl Ansatz

Programm für den LightCycler:

1. Denaturierung: 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	95°C	30sec	20°C/sec

2. Amplifikation : 45 Zyklen

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	58°C	10sec	20°C/sec single
3.	72°C	20sec	20°C/sec

3. Schmelzen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	50°C	40sec	20°C/sec
3.	85°C	0sec	0,2°C/sec continuous

4. Kühlen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	40°C	60sec	20°C/sec

Messung des HSV im Kanal F2/F1 und des Baculovirus im Kanal F3/F1

### 7.2.6 CMV

Mastermix für einen Ansatz:	Aqua ad iniectiblia	5,7µl ad 15,0µl
	BSA 2mg/ml	1,0µl
	Nucleotide 10mM	0,5µl
	Magnesiumchlorid 50mM	1,6µl
	10-fach PCR Puffer	2,0µl
	Primer CMV 1 10µM	1,0µl
	Primer CMV 2 10µM	1,0µl
	Sonde CMV FL 3pM	1,0µl
	Sonde CMV LC 3pM	1,0µl
	Taq Polymerase	0,2µl
		= 15,0µl Mastermix
		+5,0µl isolierte DNA
		= 20,0µl Ansatz

Programm für den LightCycler:

1. Denaturierung: 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	95°C	30sec	20°C/sec

2. Amplifikation : 45 Zyklen

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	58°C	10sec	20°C/sec single
3.	72°C	20sec	20°C/sec

3. Schmelzen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	50°C	40sec	20°C/sec
3.	85°C	0sec	0,2°C/sec continous

4. Kühlen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	40°C	60sec	20°C/sec

Messung im Kanal F2/F1

### 7.2.7 CMV mit Baculovirus

Mastermix für einen Ansatz: Aqua ad iniectionem	1,7µl ad 15,0µl
BSA 2mg/ml	1,0µl
Nucleotide 10mM	0,5µl
Magnesiumchlorid 50mM	1,6µl
10-fach PCR Puffer	2,0µl
Primer CMV 1 10µM	1,0µl
Primer CMV 2 10µM	1,0µl
Sonde CMV FL 3pM	1,0µl
Sonde CMV LC 3pM	1,0µl
Primer Baculovirus 8.1s 10µM	1,0µl
Primer Baculovirus 8.2@s 10µM	1,0µl
Sonde Baculovirus FL 1pmol	1,0µl
Sonde Baculovirus 705 1pmol	1,0µl
Taq Polymerase	0,2µl
	= 15,0µl Mastermix
	+5,0µl isolierte DNA
	= 20,0µl Ansatz

Programm für den LightCycler:

1. Denaturierung: 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	95°C	30sec	20°C/sec

2. Amplifikation : 45 Zyklen

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	58°C	10sec	20°C/sec single
3.	72°C	20sec	20°C/sec

3. Schmelzen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
1.	95°C	0sec	20°C/sec
2.	50°C	40sec	20°C/sec
3.	85°C	0sec	0,2°C/sec continuous

4. Kühlen : 1 Zyklus

	Zieltemperatur	Plateauzeit	Anstieg
	40°C	60sec	20°C/sec

Messung des CMV im Kanal F2/F1 und Baculovirus im Kanal F3/F1

### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. U. G. Liebert danke ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten und praxisnahen Themas sowie die intensive Betreuung.

Als nächstes gilt mein Dank Melanie Maier, die mich zunächst das wissenschaftliche Arbeiten und die verschiedenen Techniken gelehrt hat. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme.

Die Arbeit wäre auch nicht ohne Romy Schmalz entstanden, die das Baculovirus angezüchtet und zur Verfügung gestellt hat.

Des Weiteren danke ich Fabienne Jospin, Grit Szczepankiewicz, Sandra Bergs und Bianca Rudolph für die alltägliche Unterstützung im Labor.

Außerdem hätte ich die Arbeit nicht ohne die Unterstützung von meinen Eltern, sowie meinem Ehemann vollendet, die mich immer wieder motiviert haben, die Arbeit zu vollenden. Ihnen danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

## **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift



---